

N° d'enregistrement

C.N.R.S. : AO 5634

T H E S E

de

Doctorat d'Etat ès-Sciences Naturelles

présentée

A LA FACULTE DES SCIENCES DE PARIS

par

Monsieur Jean GUERDOUX

pour obtenir

le grade de Docteur ès-Sciences

Sujet de la Thèse : Réversion méiotique du mutant nicotinique
deux de *Coprinus radiatus*.

8 JUIN 1971

Soutenue le :

devant la commission d'examen

M. G. RIZET

Président

Mme M. GANS

Examineurs

MM. J. GUERN

"

P. VIGIER

"

N° d'enregistrement

C.N.R.S. : AO 5634

T H E S E

de

Doctorat d'Etat ès-Sciences Naturelles

présentée

A LA FACULTE DES SCIENCES DE PARIS

par

Monsieur Jean GUERDOUX

pour obtenir

le grade de Docteur ès-Sciences

Sujet de la Thèse : Réversion méiotique du mutant nicotinique
deux de *Coprinus radiatus*.

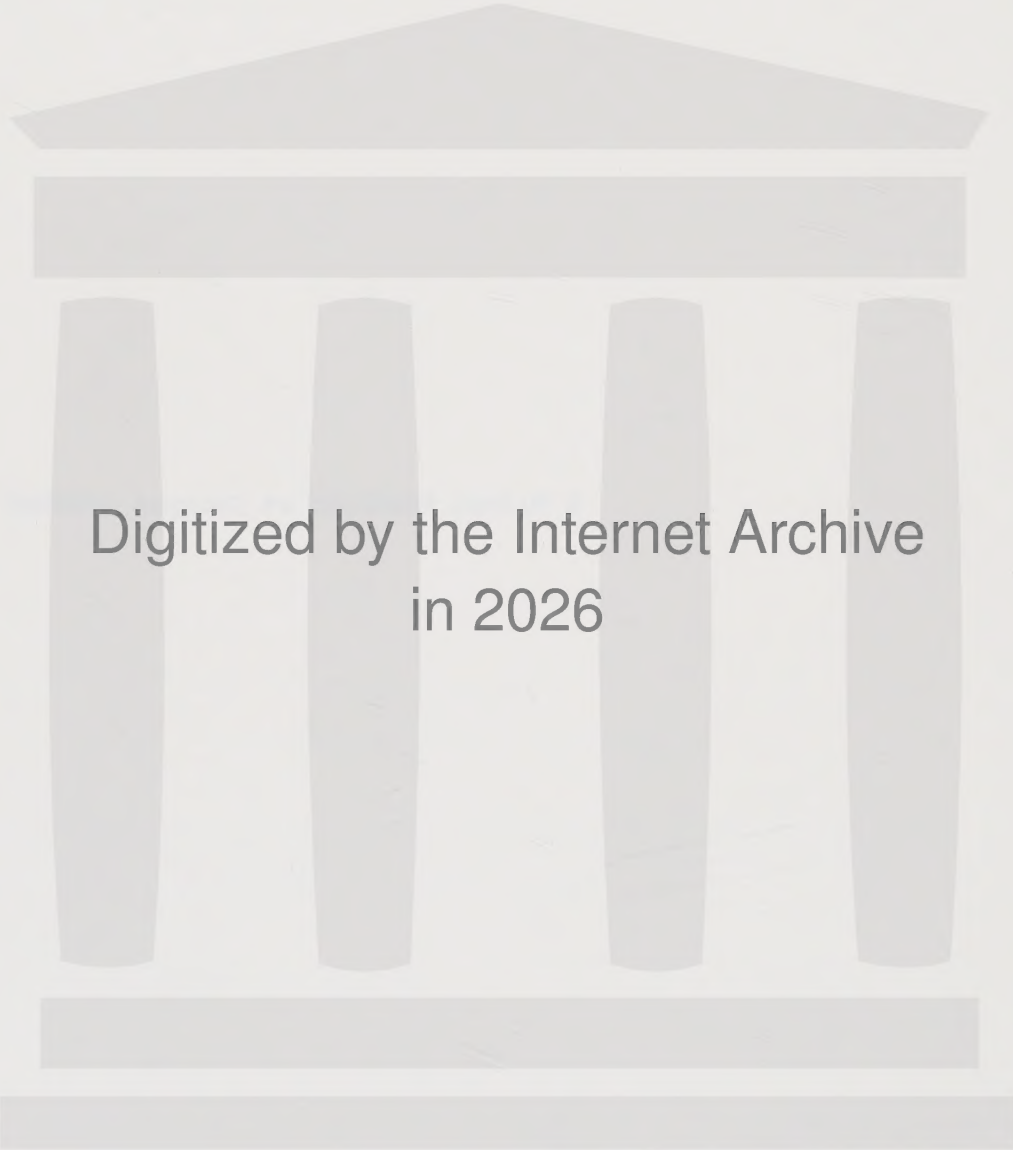
Soutenue le :

devant la commission d'examen

M.	G. RIZET	Président
Mme	M. GANS	Examineurs
MM.	J. GUERN	"
	P. VIGIER	"



A Michel PRADINES et Georges PREVOST



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41556004_0015

"..... tant que nous pourrons penser à notre
guise, et parler comme nous pensons, la condi-
tion de l'homme continuera à s'améliorer".

Th. JEFFERSON

(Scripta Mathematica 1932, 31, pp.81/87)

Je remercie Madame le Professeur M. GANS, Monsieur le Professeur J. GUERN, Monsieur le Professeur G. RIZET et Monsieur le Professeur P. VIGIER d'avoir bien voulu juger ce travail.

Monsieur RIZET et Madame GANS m'ont permis de suivre le troisième cycle de Génétique dans de bonnes conditions : je les remercie également à ce titre puisque le travail que je présente n'aurait pas été réalisé sans cette aide matérielle.

Madame GANS m'a ensuite accueilli dans son laboratoire et a consacré une grande partie de son temps et de sa patience à ma formation : l'ambiance extraordinairement bonne qu'elle a su créer, avec Monsieur Georges PREVOST, n'a pas que peu contribué à rendre enrichissante ma vie au laboratoire. Je la remercie pour cela encore.

Les membres de l'équipe que je tiens à remercier également pour avoir été toujours disponibles, Denise CABET-BUSSON, Michèle MASSON, Roland MOTTA et Nicole PRUD'HOMME, ont été et restent des compagnons de travail comme il est difficile d'imaginer pouvoir en rencontrer beaucoup.

Le travail expérimental a tout d'abord été réalisé par Mademoiselle Lilyane DELMOTTE que je remercie vivement. Il a ensuite été mené à son terme actuel par Madame Monique SCHMALTZ avec dévouement et compétence : tous mes remerciements vont à cette excellente collaboratrice.

Mademoiselle Annie DESAEGER, avec beaucoup de bonne humeur, a supporté les nombreux changements et les versions successives du manuscrit : merci à elle et à tous ceux, en particulier Marie Anne CHANCEREL, qui ont contribué à la réalisation de cette thèse.

P U B L I C A T I O N S

- Article A : - Dosage et régulation de la tryptophane synthétase chez le *Coprinus radiatus*.
C. R. Acad. Sci. T.264 pp. 1323-1326 (1967).
- Article B : - Induction de la cynuréninase par la cynurénine, les tryptophane et 5-methyltryptophane chez le *Coprinus radiatus*.
C.R. Acad. Sci.T.265 pp. 681-684 (1967).
- Article 1 : - Réversion à haute fréquence d'un gène nicotinique moins chez le *Coprinus radiatus*.
Molec. Gen. Genetics vol.105 pp.334-343 (1969).
- Article 2 : - Modifications de la haute fréquence de réversion du mutant nic-2 chez le *Coprinus radiatus*.
Molec. Gen. Genetics vol. 110 pp.307-326 (1971).
- Article 3 : - Réversion à haute fréquence du mutant nicotinique deux du *Coprinus radiatus* : Etude de souches nic-2 homothalliques ou diploïdes.
En préparation pour être soumis à Molec. Gen. Genetics.

A N N E X E S

- 1 - Origine et propriétés générales.
- 2 - Mise en évidence de la déficience métabolique de nic-2.
- 3 - Compléments à l'article 2.
- 4 - Recherche d'une composante cytoplasmique.
- 5 - Influence de fa sur F.
- 6 - Mise en évidence d'une transformation F $\longrightarrow$ fn.
- 7 - Compléments à l'étude des sauvages illégitimes.
- 8 - Recombinaisons entre marqueurs encadrant nic-2 dans un croisement homozygote mutant.

INTRODUCTION

L'étude de la régulation de la biosynthèse et du catabolisme du tryptophane chez le *Coprinus radiatus* nous a été tout d'abord proposé comme sujet. Certains enzymes intervenant dans la dégradation du tryptophane étant également impliqués dans la biosynthèse de l'acide nicotinique, nous avons été amenés à étudier des mutants nicotinique moins, en particulier le mutant nicotinique deux (nic-2).

Ce mutant s'est avéré posséder des caractéristiques génétiques inattendues dont le rapport fera l'objet principal de notre mémoire, sans que nous développions les autres résultats obtenus dans l'optique première de notre travail.

Il nous a néanmoins semblé nécessaire d'inclure ici les données expérimentales physiologiques concernant directement le mutant étudié. Elles seront données dans les deux annexes qui suivent.

La part prépondérante du travail que nous présentons sera exposée en trois parties. La première est la somme de résultats expérimentaux, consignés ici dans des articles et des annexes : nous y décrirons l'instabilité du mutant nic-2, qui réverse avec une grande fréquence lors de la méïose, et peut se présenter sous plusieurs "formes", conduisant à des réversions plus ou moins importantes.

La deuxième partie résumera des exemples de gènes instables connus dans la littérature : elle sera suivie d'une troisième partie comportant des essais d'interprétations des résultats que nous avons obtenus.

P L A N

-+-+--

	n° des pages
Présentation du mutant étudié.	
<u>Annexe 1</u> : origine et propriétés générales	1
<u>Annexe 2</u> : Mise en évidence de la déficience métabolique de <u>nic-2</u>	2 à 8
suivie de : <u>Article A</u> : dosage et régulation de la trypto- phane synthétase chez le <i>Coprinus radiatus</i>	9 à 12
<u>Article B</u> : induction de la cynuréninase par la cynurénine, les tryptophane et 5-methyltrypto- phane chez le <i>Coprinus radiatus</i>	13 à 16
Etude de l'instabilité génétique de <u>nic-2</u> .	
I - Données expérimentales	
1. <u>Articles et Annexes</u>	
<u>Article 1</u> : Réversion à haute fréquence d'un gène nicotinique moins chez le <i>Coprinus radiatus</i>	17 à 26
<u>Article 2</u> : Modifications de la haute fréquence de réversion du mutant <u>nic-2</u> chez le <i>Coprinus radiatus</i>	27 à 46
<u>Annexe 3</u> : Compléments à l'article 2	47 à 53
<u>Annexe 4</u> : Recherche d'une composante cytoplasmique	54 à 62
<u>Annexe 5</u> : Influence de <u>fa</u> sur <u>F</u>	63 à 72
<u>Article 3</u> : Réversion à haute fréquence du mutant nicotinique deux du <i>Coprinus radiatus</i> : Etude de souches <u>nic-2</u> homothalliques ou diploïdes	73 à 85
<u>Annexe 6</u> : Mise en évidence d'une transformation <u>F</u> → <u>fn</u>	86
<u>Annexe 7</u> : Compléments à l'étude des sauvages illégitimes ..	87 à 89
<u>Annexe 8</u> : Recombinaisons entre marqueurs encadrant <u>nic-2</u> dans un croisement homozygote mutant	90 à 92
2. <u>Résumé des résultats</u>	93 à 102
II - Exemples de gènes instables	103 à 107
III - Essais d'interprétation	108 à 128
Résumé	129
Bibliographie	130 à 138

PRESENTATION DU MUTANT ETUDIE

1. Origine et propriétés générales.

2. Mise en évidence de la déficience métabolique de nic-2.

Annexe 1

Origine et propriétés générales de nic-2.

Nic-2 a été obtenu après action mutagène de l'acide nitreux. Sa croissance sur milieu synthétique minimum est quasi nulle quant on repique de petits inoculums ou des spores. Quand les inoculums sont gros, la croissance résiduelle n'est pas négligeable, ceci pouvant être dû au faible besoin (1 µg / ml) en acide nicotinique du mutant.

L'obtention de dicaryons et de fructifications ne pose aucun problème, que nic-2 soit à l'état hétérozygote ou homozygote, et que les souches aient ou non été isogénisées. Les souches nic-2 forment très facilement et très rapidement des dicaryons et l'on obtient sans difficulté des carpophores souvent très volumineux.

Ceci n'est pas le cas général chez le Coprin : souvent un dicaryon homozygote mutant est difficile à constituer et les fructifications difficiles à obtenir, d'autant plus que les souches sont isogéniques.

Mis à part cette caractéristique, dont l'étude systématique n'a pas été faite, nic-2 ne se distingue pas des autres mutants à exigence nutritionnelle obtenus chez le Coprin.

Annexe n° 2

Mise en évidence de la déficience métabolique de nic-2.

La biosynthèse de l'acide nicotinique se fait à partir du tryptophane chez le *Neurospora crassa* (MATCHETT et De MOSS 1963) -figure 1-. L'étude de mutants tryptophane exigeants (article A) montre qu'elle doit s'effectuer d'une façon comparable chez le Coprin.

En effet, le mutant tryptophane trois (tr-3), croît parfaitement en présence de cynurénine ou de formyl-cynurénine, métabolites qui n'assurent pas la croissance des autres mutants tryptophane exigeants (tr-6, tr-5 et tr-1) (figure 1). On peut donc penser que les deux métabolites sont transformés en acide anthranilique, qui remplace alors le tryptophane pour assurer la croissance de tr-3.

D'autre part, on a pu montrer que le mutant tr-1 et le double mutant tr-1 tr-3 (figure 1) accumulent de l'indole glycérol, lorsqu'ils sont cultivés sur un milieu contenant une quantité importante (plus de 20 γ /ml) de tryptophane : il est donc probable que cette accumulation est due au fonctionnement du cycle tryptophane-anthranilate.

Enfin deux enzymes de la chaîne supposée, la cynuréninase (article B) et la formyl cynuréninase ont pu être mises en évidence.

Ces diverses expériences, permettent de montrer que les étapes de la biosynthèse de l'acide nicotinique chez le Coprin sont très probablement les mêmes que celles décrites chez le *Neurospora* (figure 1).

Ceci étant, nous nous sommes intéressés au mutant nic-2 pour tenter de préciser quelle était l'étape synthétique qui n'était pas assurée.

On a fourni au mutant les métabolites intermédiaires de la biosynthèse de l'acide nicotinique. Les résultats du tableau n° 1 montrent que le besoin en acide nicotinique n'est pas satisfait par le tryptophane, la formyl cynurénine ou la cynurénine. Par contre, l'auxotrophie est guérie par l'hydroxycynurénine et à un moindre degré par l'hydroxyanthranilate. La croissance observée en présence de ce dernier produit est très largement supérieure à celle du mutant sur un milieu minimum mais est inférieure à celle obtenue sur un milieu additionné d'acide nicotinique : il peut, par exemple, s'agir d'un pro-

blème de pénétration, mais nous n'avons pas précisé ce point.

Néanmoins, ceci indique d'une part que ces deux métabolites sont bien des intermédiaires de la biosynthèse de l'acide nicotinique. D'autre part, on peut conclure des résultats présentés que le mutant nic-2 n'est pas capable de transformer la cynurénine en hydroxycynurénine. Il pourrait donc être déficient en cynurénine hydroxylase (EC. 1. 14. 1. 2).

La croissance sur milieu contenant de l'acide anthranilique n'était pas prévisible (figure 1). Néanmoins, elle peut être facilement interprétée en imaginant que la transformation directe de ce produit en hydroxyanthranilate est possible chez le Coprin. Pour prouver l'existence de cette transformation, il serait nécessaire d'entreprendre des études biochimiques.

Pourtant, l'étude d'un croisement nic-2 x tr-6 a permis de donner une première confirmation à cette hypothèse.

La souche nic-2 utilisée étant (F) (voir plus loin), des tétrades à ségrégation $3^+ 1^-$ et $4^+ 0^-$ sur milieu additionné de tryptophane, doivent être rencontrées. En admettant que la réversion se produit avec une fréquence de 25 %, on s'attend à observer 1/16 des tétrades à ségrégation $4^+ 0^-$. Or 5 des 8 tétrades étudiées étaient de ce type, en première approximation. Ce résultat aberrant a été infirmé, tout d'abord en montrant que l'allèle nic était présent dans des souches supposées prototrophes pour l'acide nicotinique : par exemple le croisement de T1c, T8b et T8c avec des souches nic-2 iso-2 compatibles donne des dicaryons ne se développant pas sur milieu minimum.

D'autre part (tableau 2), les souches issues de spores de 3 tétrades ont été ensemencées sur les différents milieux, en petits et gros inoculums. Ceci suffit pour révéler parmi les prétendues souches nic⁺, des souches qui sont en réalité auxotrophes pour l'acide nicotinique.

Cependant, même à partir de petits inoculums, les souches tr-6 nic-2, ainsi déterminées, ont une croissance, sur tryptophane, supérieure à celle d'une souche tr-6⁺ nic-2 témoin. La présence de la mutation tr-6 supprime donc, au moins partiellement, le besoin en acide nicotinique. Or, tr-6 accumule l'anthranilate (figure 1) métabolite permettant une croissance normale de nic-2 : le rapprochement entre ces deux faits indiquerait donc la possibilité d'un passage direct anthranilate - hydroxyanthranilate chez le Coprin.

Il est possible que la différence de croissance notée à partir de petits ou de gros inoculums soit due au faible besoin en acide nicotinique (1 γ /ml) du mutant nic-2. Une pousse résiduelle importante, à partir des gros inoculums de milieu naturel, permettrait immédiatement la transformation de l'anthranilate accumulé.

On notera que la croissance des souches nic-2 tr-6, en présence de concentrations différentes de tryptophane (5 γ /ml, et 500 γ /ml) est la même, ce qui semble indiquer que la production globale d'anthranilate susceptible d'être transformé en hydroxyanthranilate est identique dans ces deux conditions : il serait intéressant de connaître précisément la régulation des synthèses de ce produit soit à partir des précurseurs des acides aminés aromatiques (voie biosynthétique susceptible d'être régulée par répression), soit à partir du tryptophane (voie catabolique régulée par induction).

En conclusion, le besoin en acide nicotinique du mutant nic-2 pouvant être satisfait par l'hydroxycynurénine mais pas par la cynurénine, la déficience métabolique doit être due à une absence de cynurénine hydroxylase, dont le dosage n'a pas été entrepris. D'autre part, l'utilisation de l'anthranilate par le mutant, et la suppression de l'auxotrophie par une mutation conduisant à l'accumulation de ce métabolite, suggèrent fortement qu'existe un passage direct de l'anthranilate en hydroxyanthranilate. Ceci pose un problème intéressant pour la compréhension de la biosynthèse de l'acide nicotinique : pourquoi celle-ci nécessite-t-elle de nombreuses transformations de l'acide anthranilique, alors que ce produit peut être une source directe d'acide nicotinique.

Il est possible que ceci révèle une localisation différente des enzymes de la biosynthèse du tryptophane et de celui (ou ceux) assurant l'éventuelle transformation d'anthranilate en hydroxyanthranilate. Cette transformation n'est pas démontrée directement dans nos expériences, puisqu'aucun essai in vitro n'a été réalisé. Néanmoins un indice sérieux a été recueilli : une souche tr-6 nic-2 a une croissance non négligeable sur un milieu simplement additionné de tryptophane et on peut admettre qu'elle est due à la transformation directe en hydroxyanthranilate de l'anthranilate accumulée à cause de la mutation tr-6.

L'effet supprimeur de tr-6 sur nic-2 est en cours d'étude dans différentes conditions de milieu. Indépendamment de la recherche d'une meilleure compréhension de la synthèse de l'anthranilate, soit à partir des précurseurs des acides aminés aromatiques, soit à partir du tryp-

tophane via la cynurénine, cette étude devrait préciser la possibilité de la transformation directe anthranilate-hydroxyanthranilate évoquée plus haut.

Il est possible que, dans la souche sauvage, l'anthranilate ne soit pas libre mais lié à un complexe enzymatique : de tels complexes ont été mis en évidence chez divers organismes en particulier dans la chaîne de biosynthèse du tryptophane (HUTTER, De MOSS 1967).

Le complexe éventuel pourrait comporter la chaîne polypeptidique déterminée par tr-6⁺. Une modification de ce polypeptide pourrait libérer l'anthranilate du complexe : il deviendrait alors accessible au système enzymatique pouvant **transformer ce produit en hydroxyanthranilate.**

L'intérêt de bien connaître la suppression de nic-2 par tr-6 serait alors de pouvoir mettre au point un crible de sélection de mutations modifiant le complexe, parmi les révertants de nic-2 poussant sur milieu synthétique additionné de tryptophane.

Ce travail serait effectué avec des chercheurs suisses (R. HUTTER et H. HENKE) s'intéressant aux différents complexes évoqués, auxquels des souches tr⁻ de *Coprinus radiatus* ont déjà été envoyées.

REFERENCES

- MATCHETT, W.A. et De MOSS, J.A. : Direct evidence for a tryptophan anthranilic acid cycle in *Neurospora*,
Biochem. Biophys. acta 71, p.632 (1963).
- HUTTER, DE MOSS, J.A. : Organisation of the tryptophan pathway : a phylogenetic study of the fungi.
J. Bact., 94 p. 1896-1907 (1967).

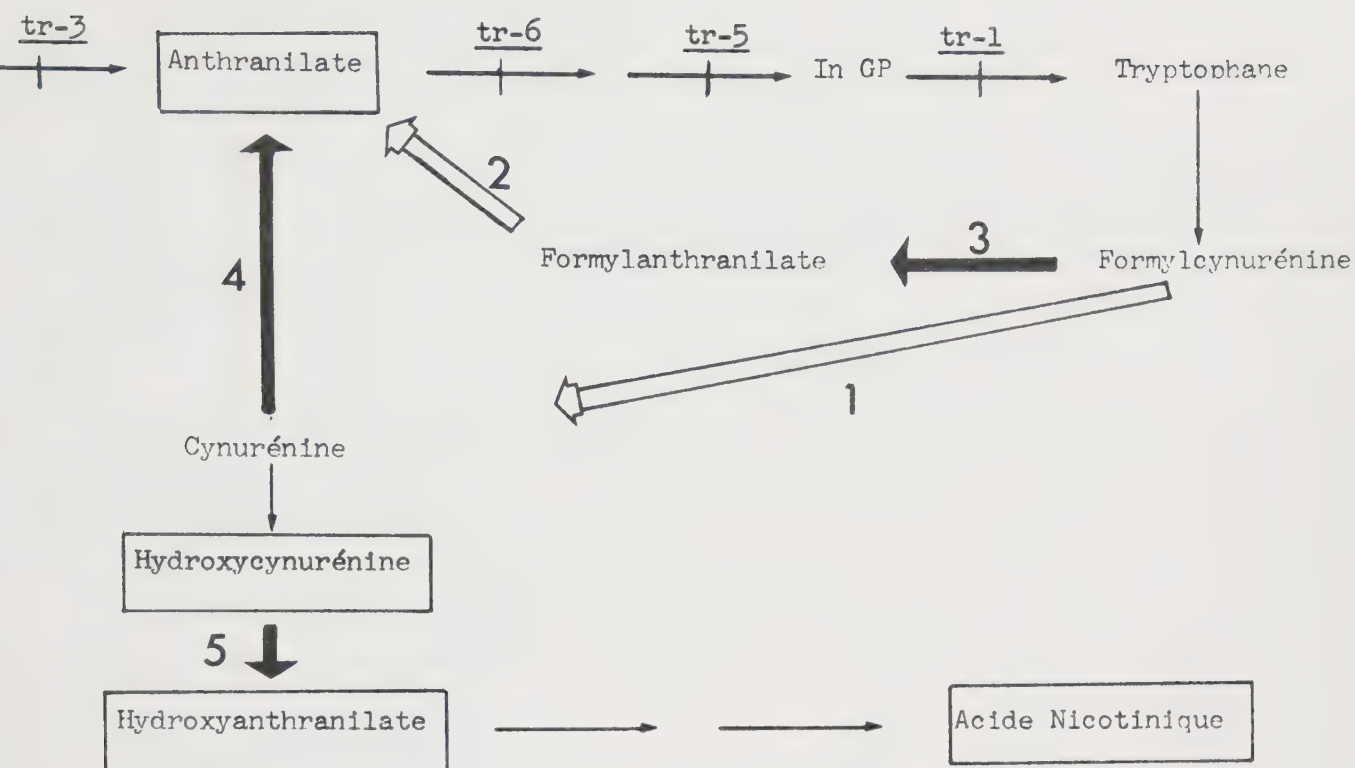
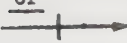


fig. 1: Biosynthèse de l'acide nicotinique

Des réactions catalysées par la formylcynuréninase () et la cynuréninase () chez le *Neurospora*, ont pu être mises en évidence (réactions 1, 4 et 5).

In GP : indole glycerol phosphate

tr
 blocs métaboliques interrompant la synthèse du tryptophane.

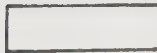
 métabolites assurant la croissance de nic-2.

Tableau n°1 : Utilisation par nic-2 des métabolites de la biosynthèse de l'acide nicotinique.

Milieu	Mn	Tr	FC	C	OHC	OHAA	Ac. Nic.	Nicamide	AA
croissance en mm de ϕ après 5 jours	ϵ	ϵ	ϵ	ϵ	22	17 g	26	28	25

L'expérience est faite à 23°. Les résultats consignés sont la moyenne du diamètre de 5 colonies.

- croissance ϵ : quelques filaments sur le milieu
 " g : grêle

- Mn = Milieu minimum

T = " " + tryptophane (5 γ /ml)
 FC = " " + formyl cynurénine (5 γ /ml)
 C = " " + cynurénine (5 γ /ml)
 OHC = " " + hydroxycynurénine (10 γ /ml)
 OHAA = " " + Hydroxyanthranilate (2 γ /ml)
 Ac. Nic = " " + acide nicotinique (2 γ /ml)
 Nicamide = " " + Nicotinamide (2 γ /ml)
 AA = " " + anthranilate (10 γ /ml)

Tableau n°2 : Recherche des souches doubles mutantes tr-6 nic-2.

souches		petits inoculums				gros inoculums	conclusion
		Mn	Nic	Tr +Nic	Tr	Tr	
T1	a	13	13	12	13	17	+
	b	ε	ε	14	11	12	tr
	c	ε	ε	15	5 g	12	tr nic
	d	17	18	17	20	17	+
T7	a	17	18	16	19	19	+
	b	ε	ε	14	7	12	tr nic
	c	18	18	17	19	17	+
	d	ε	ε	15	5	12	tr nic
T8	a	17	16	17	17	17	+
	b	ε	ε	10	5 g	11	tr nic
	c	16	14	12	17	16	+
	d	ε	4	16	9	8	tr nic
<u>nic-2 iso-2</u>		ε	17	18	ε	5	nic

croissance ε : quelques filaments sur le milieu.

" g : grêle.

ARTICLE A

GÉNÉTIQUE. — *Dosage et régulation de la tryptophane-synthétase chez le Coprinus radiatus*. Note (*) de M. JEAN-LOU GUERDOUX, présentée par M. Lucien Plantefol.

Mise en évidence par dosage enzymatique de la répression de la synthèse de la tryptophane-synthétase (4.2.1.20) par le tryptophane exogène; les conditions optimales de dérèglement pour des thalles cultivés sur un milieu solide sont discutées.

Chez le Coprin, un certain nombre de gènes intervenant dans la biosynthèse du tryptophane ont été mis en évidence (fig. 1) :



Fig. 1. — Biosynthèse du tryptophane; la correspondance entre les étapes métaboliques et les différents loci a été déterminée par l'observation soit de déficiences enzymatiques (tr 1 : tryptophane-synthétase; tr 5 : indole-glycérol-phosphate-synthétase), soit de l'utilisation ou de l'accumulation des précurseurs (tr 3, tr 6).

On a montré ⁽¹⁾ que la production d'indole-glycérol-phosphate était limitée chez la souche mutante tr 1 par de fortes concentrations en tryptophane. Pour préciser les modalités de la régulation par le tryptophane de sa propre biosynthèse, nous avons entrepris l'étude de la tryptophane-synthétase (L-sérine hydrolyase-4.2.1.20). Le but final de notre travail étant de comparer des phénomènes de régulation dans un mycélium dicaryotique et dans un mycélium diploïde ⁽²⁾, nos cultures ont été réalisées sur milieu solide, les dicaryons n'étant pas stables en milieu liquide. Le dosage de la tryptophane-synthétase se fait en mesurant la consommation d'indole selon une technique décrite par ailleurs ⁽³⁾, que nous avons adaptée au Coprin. L'activité spécifique de l'enzyme est exprimée en millimicromoles d'indole disparues en 40 mn en présence de 1 mg de protéines.

Pour pouvoir éliminer le tryptophane endogène, les expériences ont été réalisées avec la souche tr 5, déficiente en indole-glycérol-phosphate-synthétase. L'activité spécifique de la tryptophane-synthétase de cette souche sur milieu complet naturel est de 15 ± 20 . La figure 2 A représente l'évolution de l'activité spécifique au cours du temps de culture en présence de 20 μ g/ml de tryptophane, quantité ne limitant pas la croissance. La figure 2 B indique la reproductibilité des mesures.

La forte hétérogénéité des résultats à 4 et 5 jours est probablement due à l'arrêt de la croissance. Le vieillissement d'un Champignon filamentueux n'est pas homogène et il est difficile de préciser quand il commence. Par ailleurs, nous ne pouvons pas donner de résultats pour une culture de 2 jours, car elle ne fournit pas assez de protéines pour qu'on puisse doser l'enzyme.

La croissance d'une souche *tr 5 A₁ B₂* en présence de tryptophane limitant ($2 \mu\text{g/ml}$), exprimée en quantité de protéines extractibles, est

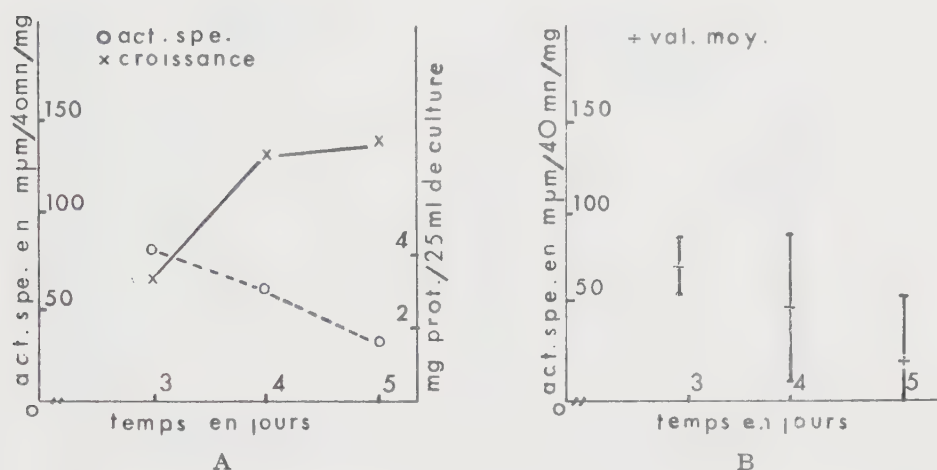


Fig. 2. — Activité spécifique en présence de tryptophane non limitant.

2 A : Évolution de la croissance et de l'activité spécifique au cours du temps dans une expérience.

2 B : Variations de l'activité spécifique dans quatre expériences.

linéaire jusqu'à 7 jours. Dans la figure 3 A est représentée l'évolution de l'activité dans ces conditions. Dans la figure 3 B sont comparés les résultats obtenus avec la souche *tr 5 A₁ B₂* utilisée normalement dans nos expériences et avec une souche *tr 5 A₁ B₂* ne différant apparemment de la première que par le groupe de compatibilité sexuelle.

L'activité spécifique est maximale pour la souche *tr 5 A₁ B₂* après 4 jours de croissance. Le même niveau n'est atteint par la souche *tr 5 A₁ B₁* qu'après 8 jours. Cette différence semble être en relation avec une croissance présentant un temps de latence plus grand.

Il est donc difficile de comparer l'activité spécifique de la tryptophane-synthétase de thalles cultivés en présence de tryptophane limitant ou non. Ceci provient pour une grande part de ce qu'on ne peut pas se placer dans des conditions de croissance déterminées et comparables. Il n'en reste pas moins qu'en moyenne, en tryptophane limitant, l'activité spé-

cifique est supérieure à celle observée en tryptophane non limitant. Nous avons pu, par un autre type d'expériences, éliminer les hétérogénéités dues à la croissance et montrer que la régulation de la tryptophane-synthétase par le produit final est réelle.

Les thalles sont cultivés sur une membrane de cellophane placée tout d'abord à la surface d'un milieu riche en tryptophane. Puis ils sont transférés sur un milieu dépourvu de tryptophane. La figure 4 A représente l'évolution de l'activité spécifique après ce transfert. L'expérience symé-

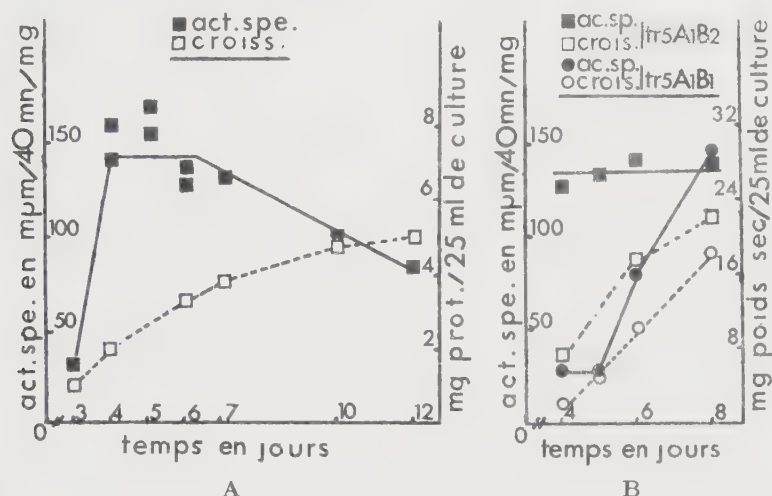


Fig. 3. — Activité spécifique en présence de tryptophane limitant.

3 A : Évolution de la croissance et de l'activité spécifique au cours du temps pour la souche *tr 5 A₁ B₂*.

3 B : Variations observées entre les souches *tr 5 A₁ B₂* et *tr 5' A₁ B₁*.

trique de la précédente consiste à cultiver des thalles sur 2 $\mu\text{g/ml}$ de tryptophane, puis à les transférer sur un milieu riche. Dans la figure 4 B est représentée l'évolution de l'activité spécifique après le transfert.

Dans le premier type d'expérience (4 A) on constate que l'activité spécifique s'élève entre 10 et 15 h et qu'elle reste constante au moins 25 h après le transfert; le tryptophane présent avant le transfert permet un doublement de masse des thalles en 20 h. Ensuite il n'y a plus de croissance significative. Le deuxième type d'expérience (4 B) montre une baisse de l'activité spécifique 24 h après le transfert sur milieu riche. Notons qu'*in vitro* le tryptophane, même à la concentration de $5 \cdot 10^{-3}$ M, ne réduit pas l'activité. *In vivo*, nous observons que l'activité spécifique est réduite de 2 à 3 fois. Cette réduction peut donc relever de phénomènes de répression.

En conclusion : chez les Bactéries, les études classiques de la croissance ont permis de préciser des conditions suffisamment contrôlables pour permettre des études d'enzymes en état de répression ou de dérépression. Nous voyons ici qu'il semble très difficile de définir des conditions semblables dans le cas d'un Champignon filamenteux.

Cependant la technique de transfert décrite ci-dessus permet, par de simples changements de milieu, d'obtenir des quantités importantes de matière homogène, sans être gêné par l'existence de temps de latence de

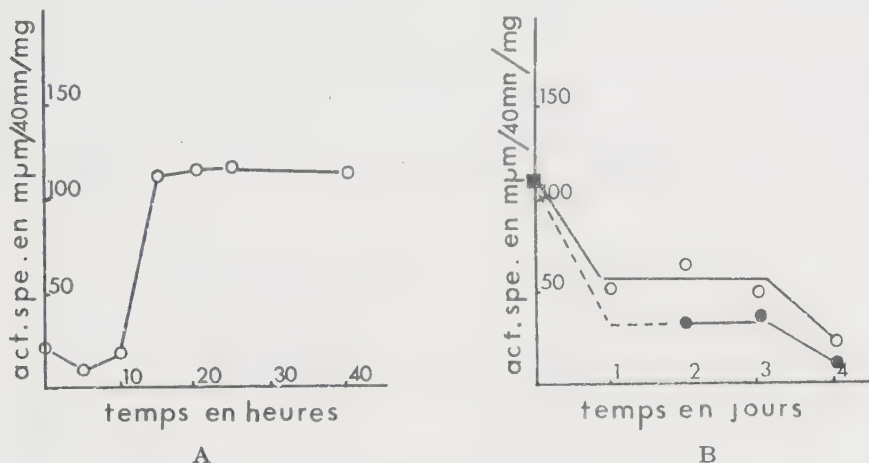


Fig. 4. — Transfert de thalles.

4 A : Évolution de l'activité spécifique au cours du temps après transfert sur un milieu dépourvu de tryptophane.

4 B : Évolution de l'activité spécifique au cours du temps après transfert sur un milieu riche en tryptophane.

○ 20 μg
● 100 μg | trypto./ml.

la croissance plus ou moins longs ou par un vieillissement prématuré des thalles. Ces transferts ne lèsent pas les mycéliums, qu'ils soient monocaryotiques ou dicaryotiques. Ils rendent possibles des études de régulation dans les diverses phases végétatives du Coprin. Les résultats obtenus grâce à cette technique montrent l'existence d'une répression de la tryptophane-synthétase par le tryptophane.

(*) Séance du 27 février 1967.

(¹) D. CABET, *Diplôme d'Études supérieures*, Paris, 1962.

(²) N. PRUD'HOMME, *Thèse Doctorat d'État*, 1966.

(³) SMITH et YANOFKY dans COLOWICK-KAPLAN, *Meth. in Enz.*, V, p. 801.

(Laboratoire de Génétique physiologique,
Centre National de la Recherche Scientifique,
Gif-sur-Yvette, Essonne
et Laboratoire de Génétique de la Faculté des Sciences de Paris,
9, quai Saint-Bernard, Paris, 5^e.)

ARTICLE B

GÉNÉTIQUE. — *Induction de la cynuréninase par la cynurénine, les tryptophane et 5-méthyl-tryptophane chez le Coprinus radiatus*. Note (*) de M. JEAN-LOUP GUERDOUX, présentée par M. Lucien Plantefol.

Mise en évidence par dosage enzymatique des caractéristiques de l'induction de la cynuréninase. La cynurénine, le tryptophane et le 5-méthyl-tryptophane augmentent de 10 fois l'activité spécifique de l'enzyme. L'étude de l'induction chez certains mutants semble montrer que la cynurénine a une action directe.

Le tryptophane n'est pas seulement l'un des acides aminés constituant des protéines, il est également le précurseur de différents métabolites. Chez l'Ascomycète *Neurospora crassa*, la transformation du tryptophane en acide nicotinique a été étudiée. On a montré ⁽¹⁾ que deux des enzymes

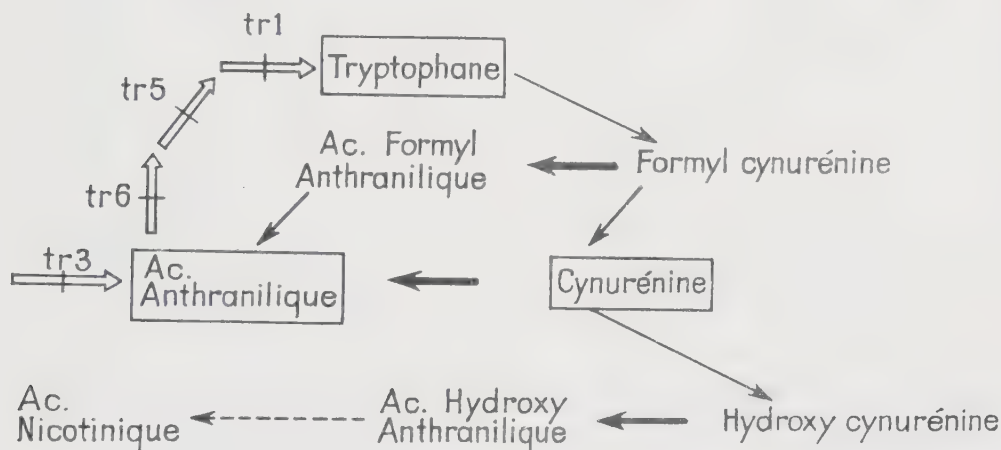


Fig. 1. — Biosynthèse de l'acide nicotinique.

$\xRightarrow{tr}$ blocs métaboliques interrompant la synthèse du tryptophane;
 $\longrightarrow$ réactions catalysées par la cynuréninase.

permettant cette transformation intervenaient également dans la production d'acide anthranilique, à partir du tryptophane. L'une d'elles, la cynuréninase, qui catalyse trois réactions de cet ensemble complexe, est connue pour être inductible ⁽²⁾ (fig. 1).

Nous nous proposons de préciser les conditions de la régulation de cette enzyme par différents précurseurs de l'acide nicotinique. Cette étude est intéressante chez le Basidiomycète *Coprinus radiatus*, où l'on pourra comparer des phénomènes de régulation chez un diploïde et chez un dicaryon.

Le dosage de l'enzyme a été fait en étudiant la transformation d'hydroxycynurénine en acide hydroxyanthranilique. L'apparition de ce produit est caractérisée par une fluorescence bleue ($\lambda_{excitation} = 3350$; $\lambda_{réception} = 4340$)

qu'on mesure au spectrofluorimètre (Jobin et Yvon). L'activité spécifique est exprimée en millimicromoles d'acide hydroxyanthranilique synthétisées en 5 mn par 1 mg de protéines.

Dans la figure 2 A est représentée l'activité spécifique de la cynuréninase de la souche sauvage, en fonction de la concentration de tryptophane ou de cynurénine dans le milieu de culture. Dans la figure 2 B est représentée l'évolution de l'activité enzymatique après transfert ⁽³⁾ d'un milieu minimal à un milieu contenant une concentration optimale de cynurénine.

Les résultats illustrés par la figure 2 A montrent que l'activité spécifique est 10 fois plus élevée sur un milieu contenant une forte concen-

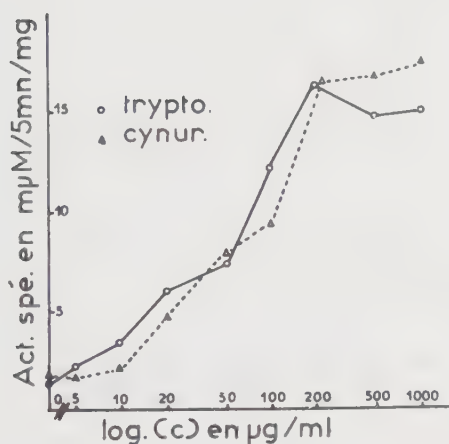


Fig. 2 A.

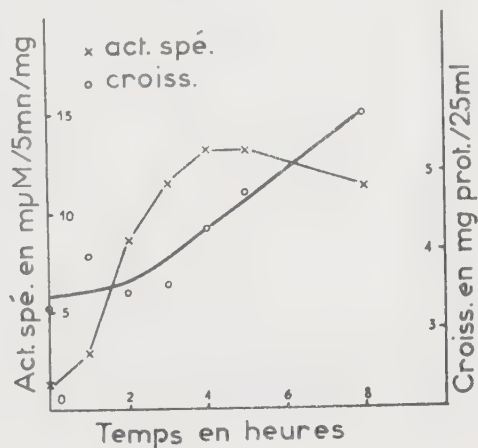


Fig. 2 B.

Fig. 2. — Influence de la cynurénine et du tryptophane sur la cynuréninase.

2 A : Activité spécifique en fonction de la concentration en « inducteur »;

2 B : Évolution de l'activité spécifique après transfert sur 200 γ /ml de cynurénine.

tration en tryptophane ou en cynurénine (200 $\mu\text{g/ml}$). Le transfert est suivi par un temps de latence de la croissance. Pendant cette période, l'activité de la cynuréninase s'accroît néanmoins.

En vue d'une étude approfondie de l'induction, il serait intéressant de posséder un inducteur gratuit. Parmi les analogues structuraux du tryptophane qui ont été étudiés (4, 5 et 6-méthyl; 4, 5 et 6-hydroxy; 5-fluoro, 7-aza tryptophane) le 5-méthyl-tryptophane (5-MT) semble jouer ce rôle. La figure 3 A représente la variation de l'activité spécifique en fonction de la concentration en 5-MT. Dans la figure 3 B sont comparées les cinétiques de l'élévation d'activité spécifique en fonction du temps, en présence de quantités optimales, soit de tryptophane soit de son analogue.

Les résultats illustrés par la figure 3 B montrent que la cinétique d'induction est la même que l'inducteur présent soit le tryptophane ou son analogue. Par contre, la concentration optimale de l'analogue est beau-

coup plus faible (20 $\mu\text{g/ml}$) que celle déterminée précédemment pour le tryptophane ou la cynurénine. Ceci peut être dû simplement au fait que le 5-MT n'est pas métabolisable : il n'est en tous cas pas une source de tryptophane pour les mutants tryptophane-exigeants.

L'étude de la cynuréninase de deux de ces mutants, tr 3 et tr 6 (fig. 1), a été entreprise pour tenter de préciser l'action des différents inducteurs. Les thalles cultivés tout d'abord en présence de tryptophane limitant sont ensuite transférés sur un milieu contenant le ou les produits à étudier. Leur activité enzymatique est déterminée 8 h après le transfert.

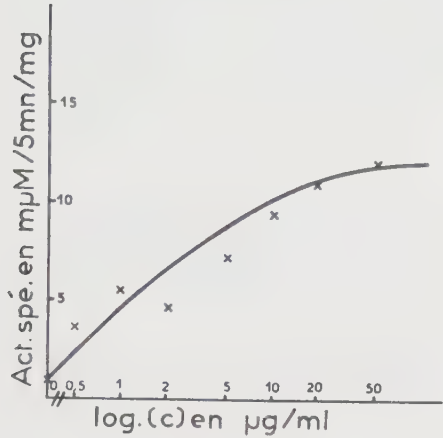


Fig. 3 A.

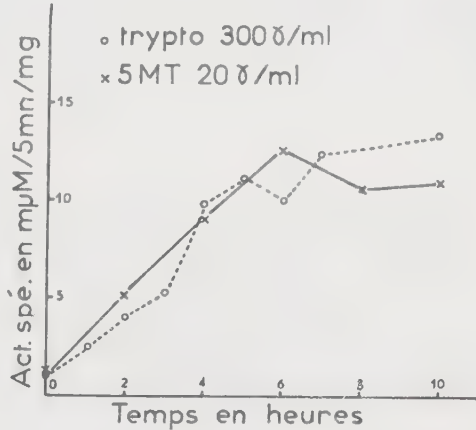


Fig. 3 B.

Fig. 3. — Influence du 5-MT sur la cynuréninase.

- 3 A : Activité spécifique en fonction de la concentration;
3 B : Comparaison des cinétiques d'induction avec transfert sur tryptophane ou 5-MT.

Les résultats d'une telle expérience sont consignés dans le tableau I.

Plusieurs conclusions peuvent en être tirées. Tout d'abord, chez le mutant tr 6, l'activité spécifique est augmentée après transfert sur un milieu additionné de cynurénine. Chez le Coprin, la transformation de la cynu-

TABEAU I.

Induction de la cynuréninase de souches tryptophane-exigeantes.
(Activités spécifiques exprimées en $\text{m}\mu\text{M}/5 \text{ mn}/\text{mg}$ protéines.)

		Après le transfert sur			
		3 $\mu\text{g/ml}$ trypto.	200 $\mu\text{g/ml}$ trypto.	200 $\mu\text{g/ml}$ cyn.	3 μg trypto + 20 $\mu\text{g/ml}$ 5-MT.
Sauvage.....	0,9	—	11,2	—	—
tr 3.....	8	7,4	20,5	17,2	13,8
tr 6.....	2,3	3,2	15,4	7,2	12,5

rénine en tryptophane ne peut s'effectuer que *via* l'acide anthranilique (le mutant tr 3 utilise la cynurénine, les mutants tr 1, tr 5, tr 6 ne l'utilisent pas). Cette transformation ne pouvant s'effectuer chez tr 6, il ne semble pas nécessaire que la cynurénine soit transformée en tryptophane pour induire l'enzyme.

D'autre part, l'activité spécifique en tryptophane limitant du mutant tr 3 est très supérieure à celle de la souche sauvage ou du mutant tr 6. Ceci suggère que l'acide anthranilique, qui ne peut être synthétisé par tr 3, intervient également dans la régulation de la cynuréninase.

Enfin le 5-MT augmente l'activité spécifique des deux mutants. Plusieurs mécanismes, plus ou moins indirects, peuvent être envisagés pour expliquer l'action de cet analogue chez les mutants aussi bien que chez la souche sauvage. Il n'est pas possible, dans l'état de notre travail, de choisir parmi eux.

(*) Séance du 3 juillet 1967.

(¹) W. H. MATCHETT et J. A. DE MOSS, *Biochim. Biophys. Acta*, 71, 1963, p. 632.

(²) S. D. WAINWRIGHT et D. M. BONNER, *Can. J. Biochem. Physiol.*, 37, 1959, p. 741.

(³) J. L. GUERDOUX, *Comptes rendus*, 264, série D, 1967, p. 1323.

(Laboratoire de Génétique physiologique,
Centre National de la Recherche Scientifique, Gif-sur-Yvette, Essonne
et Laboratoire de Génétique de la Faculté des Sciences de Paris,
9, quai Saint-Bernard, Paris, 5^e.)

ETUDE DE L'INSTABILITE GENETIQUE

DE nic - 2

-+-+-+-----

I. Données expérimentales

II. Exemples de gènes instables

III. Essais d'interprétation

I. 1 - Articles et annexes

-+-+-+-----

A R T I C L E 1

Réversion à haute fréquence d'un gène nicotinique moins chez
le *Coprinus radiatus*

J. L. GUERDOUX

Centre de Génétique Moléculaire du C. N. R. S. Gif sur Yvette (91) et faculté des sciences
d'Orsay 9, France

Reçu Juillet 7, 1969

*High Frequency of Reversion of a Nicotinic Acid Gene in *Coprinus radiatus**

Summary. The cross of the nicotinic acid requiring mutant *nic-2* with the wild type strain gives rise to the following tetrads: ($2nic^+ 2nic^-$), ($3nic^+, 1nic^-$) and ($4nic^+$). Genetic analysis has ruled out the hypothesis that the nicotinic acid requirement of this mutant is controlled by several loci. The *nic-2* marker has been precisely located on chromosome II of *Coprinus*. It reverts with high frequency (20 to 30 %) to the wild type allele. Reversion is not the result of recombination (at least directly). It seems to be an autonomous property of the marker.

Introduction

L'existence de ségrégations chromosomiques non mendéliennes est maintenant classique. Plusieurs types d'explications ont été proposés. Chez le maïs un gène mutateur a pu être mis en évidence (Mc Clintock, 1950). Le crossing over sous forme inégale (Sturtevant, 1927) a été jugé responsable d'anomalies survenant à la méiose chez la levure (Magni, 1963) et le *Neurospora* (Bausum, 1965). Une revue des cas s'interprétant en termes de conversion chez les champignons a été faite (Whitehouse, 1965).

En plus de ces exemples génétiquement bien définis, on a découvert un état d'instabilité de certains gènes chez la drosophile (Demerec, 1963; Green, 1967), la salmonelle (Demerec, 1963) et le maïs (Brink, 1968).

Nous nous proposons de décrire une situation génétique rencontrée chez le Coprin et de voir si elle peut être rattachée à l'un des groupes d'explications proposées ci-dessus.

Matériel et méthodes

La souche mutante étudiée est acide nicotinique exigeante: elle est appelée nicotinique deux (*nic-2*). Elle a été isolée au laboratoire par M. Gans, à partir de la souche sauvage de référence dix fois isogénisée (*+iso 10*), après action mutagène du nitrite de sodium. Les souches *nic-2* possèdent un faible résidu de croissance sur milieu minimum. Elles sont stables en multiplication végétative, que ce soit à l'état haploïde ou dicaryotique. D'après les besoins nutritionnels du mutant et le fait qu'il nourrisse partiellement un mutant tryptophane moins sachant utiliser la cynurénine (Guerdoux, 1967), il est probable que la souche est déficiente en cynurénine hydroxylase (EC 1. 14. 1. 2.); le dosage de cette enzyme n'a pas été entrepris.

Les différents milieux de culture et souches mutantes utilisés, la technique d'analyse des tétrades et la réalisation du test de complémentation fonctionnelle ont été décrits précédemment (Prevost, 1962).

Les tétrades sont numérotées dans l'ordre de leur prélèvement sur les basides et leurs 4 spores notées a, b, c, d. Les distances génétiques sont exprimées en unités de crossing over (U. C. O.).

Résultats expérimentaux et discussion

Croisement de la souche mutante et de la souche sauvage de référence

La souche de départ (*nic-2D*) était de groupe sexuel *A-2 B-2*. Les résultats de 3 isogénisations sont consignés dans le tableau 1.

1. Dans ces trois générations, même quand interviennent deux souches *+iso 10* de groupes sexuels différents on observe des tétrades dites normales (*2nic⁺, 2nic⁻*) et des tétrades dites anormales (*3nic⁺, 1nic⁻* ou *4nic⁺*). Il apparait donc que le caractère nicotinique moins n'est pas sous la dépendance d'un gène à ségrégation mendélienne classique.

*Etude des tétrades issues du croisement *nic-2 iso2 A-2 B-2* × *+iso10 A-1 B-1**

Les tétrades provenant du croisement d'une souche *nic-2* deux fois isogénisée (*nic-2 iso2 A-2 B-2*) par *+iso10 A-1 B-1* (voir Tableau 1), ont été utilisées pour la suite des expériences.

Tableau 1. Résultats de 3 isogénisations (*nic-2D* = souche de départ, *nic-2 iso1* = souche isogénisée 1 fois, *nic-2 iso2* = souche isogénisée 2 fois)

Souche <i>nic-2</i>	Type de tétrades	Groupe sexuel du <i>+iso10</i> utilisé	
		<i>A-1 B-2</i>	<i>A-1 B-1</i>
<i>nic-2D</i>	<i>2nic⁺ 2nic⁻</i>	11	
	<i>3nic⁺ 1nic⁻</i>	3	non réalisable
	<i>4nic⁺</i>	2	
<i>nic-2 iso1</i>	<i>2nic⁺ 2nic⁻</i>	10	
	<i>3nic⁺ 1nic⁻</i>	2	n'a pas été fait
	<i>4nic⁺</i>	0	
<i>nic-2 iso2</i>	<i>2nic⁺ 2nic⁻</i>	5	14*
	<i>3nic⁺ 1nic⁻</i>	1	11* (Dont T7, T11, T22, T30)
	<i>4nic⁺</i>	0	1* (T8)

Les tétrades marquées d'une astérisque ont été utilisées dans la suite du travail.

1. Les tests de ces tétrades ont été faits sur milieux synthétiques deux fois de façon indépendante. Les résultats se sont avérés entièrement reproductibles. Il apparait donc clairement que le caractère mutant, qui d'ailleurs est stable en multiplication végétative, ne disparaît pas à la suite d'une induction enzymatique puisqu'il n'y a aucune raison pour que ce soit toujours les mêmes individus qui évoluent vers le phénotype sauvage.

2. Nous avons réalisé des dicaryons avec les souches *nic-2 iso2* et les 4 thalles de tétrades anormales à 3 (tétrades 7, 11, 22, 30 du tableau 1) ou 4 (tétrade 8 du même tableau) individus sauvages. Tous les dicaryons formés à partir des individus phénotypiquement sauvages sont prototrophes, tandis que ceux formés à partir des thalles exigeant l'acide nicotinique ont une croissance non significative sur milieu minimum.

Ce résultat permet d'exclure l'existence d'un gène récessif (*su*), suppresseur du besoin en acide nicotinique, dans le matériel héréditaire de la souche sauvage de référence.

En effet, un dicaryon *nic-2 su/ nic-2 su*⁺ devrait être auxotrophe. Or nous avons vu que *tous* les dicaryons formés à partir d'individus prototrophes (certains devant être *nic-2 su*) et de souches *nic-2 iso2* (*nic-2 su*⁺ dans notre hypothèse) avaient une croissance normale sur milieu minimum. Il est donc clair que l'hypothèse formulée est à rejeter.

3. On pourrait admettre que le caractère mutant est dû à la conjonction de deux gènes mutés : au génotype *ab* correspondrait le phénotype *nic-2*, tandis qu'aux génotypes *a⁺b⁺*, *ab⁺* et *a⁺b* correspondrait le phénotype sauvage. Remarquons que, d'après les fréquences des différents types de tétrades observées au cours de l'isogénisation (Tableau 1), les deux gènes seraient liés, leur distance étant, approximativement, de 20 U. C. O.. Lorsqu'on croise deux individus sauvages d'une tétrade anormale à 3 sauvages, on a une chance sur trois que l'un soit de génotype *a⁺b* et l'autre *ab⁺*; on a deux chances sur trois qu'il en soit ainsi lorsque les deux individus sauvages proviennent de tétrades anormales à 4 sauvages. Dans la descendance d'un croisement *a⁺b* × *ab⁺* devraient apparaître des individus mutants, avec une fréquence de 0,1. Or, dans aucun des croisements entre individus sauvages provenant de tétrades anormales, n'ont été décelés d'individus mutants (Tableau 2).

Tableau 2. Résultats de croisements entre individus de tétrades anormales tous phénotypiquement sauvages

Les tétrades sont issues de croisement *nic-2 iso2 A-2 B-2* × *+iso10 A-1 B-1* (voir Tableau 1).

Les tétrades No. 7, 11, 22, 30 ont 3 individus sauvages, la tétrade No. 8 en a quatre.

En général 30 tétrades ont été prélevées par croisement. Quand le nombre de tétrades complètes obtenu est inférieur à 10, toutes les spores germées ont été analysées.

Spores utilisées dans le croisement	Tétrades à quatre individus sauvage	Spores sauvages
<i>7a</i> × <i>7c</i>	16	
<i>11a</i> × <i>11d</i>	22	
<i>22b</i> × <i>22a</i>	14	
<i>22b</i> × <i>22c</i>	2	30
<i>30c</i> × <i>30b</i>	21	
<i>30c</i> × <i>30d</i>	19	
<i>8a</i> × <i>8d</i>	13	
<i>8b</i> × <i>8c</i>	3	14
<i>30b</i> × <i>22c</i>	10	
<i>30d</i> × <i>22c</i>		17

L'absence d'individus mutants ne plaide pas en faveur d'une situation digénique. Néanmoins, l'étude ayant porté sur un nombre limité de croisements et les descendance étudiées étant, dans certains cas, peu nombreuses, on a réalisé un autre type d'expérience pour rejeter définitivement cette possibilité.

Réversion à haute fréquence d'un gène nicotinique moins chez le *Coprinus radiatus*

Tableau 3. Croisement en retour des quatre individus phénotypiquement sauvage de tétrades anormales

20 tétrades ont été examinées par croisement. Seules les tétrades complètes sont reportées ici.

Les spores 8a et 8c front partie de la tétrade No. 8 signalée dans le Tableau 2.

Les spores 4b, 4c, 4d sont membres d'une tétrade à quatre spores sauvages issue du croisement T8c $\times$ *nic-2 iso2 A-2 B-1*.

Croisement réalisé	Tétrades obtenues		
	2 <i>nic</i> ⁺ 2 <i>nic</i> ⁻	3 <i>nic</i> ⁺ 1 <i>nic</i> ⁻	4 <i>nic</i> ⁺
T8a $\times$ <i>nic-2 iso2 A-1 B-1</i>	1	1	0
T8c $\times$ <i>nic-2 iso2 A-2 B-1</i>	6	2	3 (dont T4)
T4b $\times$ <i>nic-2 iso2 A-1 B-2</i>	5	8	0
T4c $\times$ <i>nic-2 iso2 A-2 B-1</i>	7	4	3
T4d $\times$ <i>nic-2 iso2 A-1 B-1</i>	1	2	0

4. Le Tableau 3 donne les résultats de croisements d'individus issus de 2 tétrades anormales à 4*nic*⁺ (tétrades No. 8 et No. 4) avec la souche *nic-2 iso2*. La tétrade No. 8a été décrite précédemment (Tableau 1). La tétrade n°4 provient du croisement en retour de la spore 8c avec *nic-2 iso2 A-1 B-1*.

Dans l'hypothèse de 2 gènes mutés proposée plus haut, les quatre spores de la tétrade No. 8 étant phénotypiquement sauvages, leurs génotypes s'écriraient *a*⁺*b*, *a*⁺*b*, *ab*⁺, *ab*⁺: seules des ségrégations 2/2 devraient alors être trouvées quand on effectue des croisements avec *nic-2 iso2* (*ab*). Or, dans tous les cas, des tétrades anormales ont été mises en évidence. Une situation digénique peut donc être définitivement exclue.

Envisageons la présence simultanée de trois gènes mutés, liés, *a b c*, dans la souche *nic-2*, ces gènes étant tous trois nécessaires à la réalisation du phénotype mutant. Les tétrades anormales (4*nic*⁺) provenant du croisement de la souche *nic-2* avec la souche sauvage (*a b c* $\times$ *a*⁺*b*⁺*c*⁺), telle la tétrade No. 8, seraient composées d'individus renfermant un ou deux des gènes en cause sous forme allélique sauvage. Considérons la spore 8c de la tétrade No. 8. Etant donné que le croisement 8c avec la souche *nic-2 iso2* donne naissance à des tétrades anormales, il faut admettre la présence de deux des gènes sous forme allélique sauvage. Le génotype de la spore 8c serait, par exemple, *a*⁺*b*⁺*c*. Le croisement 8c $\times$ *nic-2 iso2* s'écrirait donc *a*⁺*b*⁺*c* $\times$ *abc*; il donnerait naissance à des tétrades anormales (4*nic*⁺), telle la tétrade No. 4, dont les quatre spores auraient pour génotypes soit *a*⁺*bc* soit *ab*⁺*c*. Dans ce cas, les nouveaux croisements en retour effectués ne devraient donner naissance qu'à des tétrades à ségrégation 2*nic*⁺ 2*nic*⁻. Comme il n'en est rien (Tableau 3), on est en droit d'exclure l'hypothèse proposée.

Il ressort de l'ensemble des résultats analysés qu'une situation multigénique est très improbable. Admettons donc qu'un seul gène soit en cause. Dans ces conditions, une analyse génétique de sa localisation et de son influence éventuelle sur la recombinaison est possible.

Recombinaison et réversion

Différentes interprétations sont proposées pour expliquer des ségrégations non mendéliennes dans un croisement mutant par sauvage, ou pour interpréter

l'apparition incongrue d'individus sauvages dans un croisement mutant $\times$ mutant. Dans plusieurs cas, elles se basent sur un rapport direct entre le phénomène étudié et la recombinaison.

Pour étudier ce genre de relations, il fallait pouvoir localiser le gène *nic-2* et disposer de gènes marqueurs l'encadrant. Des croisements avec les différents gènes marqueurs des chromosomes du Coprin ont donc été réalisés. Dans tous les cas

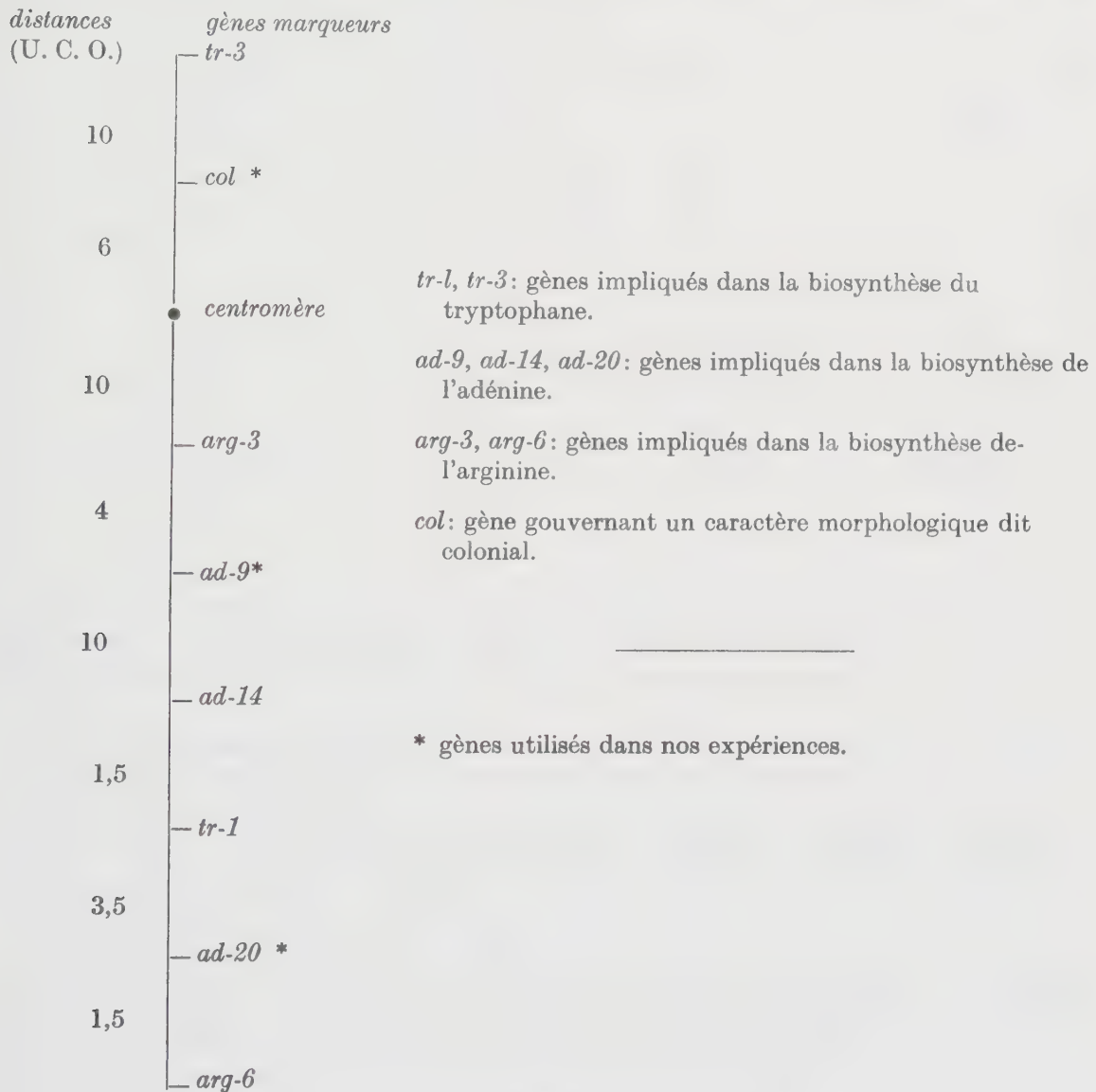


Fig. 1. Chromosome II du Coprin

la ségrégation des marqueurs était normale. En ne tenant compte que des tétrades à ségrégations mendélienne pour le caractère nicotinique moins, une liaison nette avec un gène adénine (*ad-9*) a été relevée. Ce gène fait partie du groupe de liaison No. II du Coprin représenté dans la figure 1 (Prevost, 1962).

Une souche *nic-2 ad-9* a été isolée et l'on a réalisé deux croisements avec des mutants du chromosome II. Le Tableau 4 donne les résultats du croisement avec le gène *col* (mutant morphologique colonial) situé à gauche à la fois d' *ad-9* et du centromère (fig. 1). Le Tableau 5 donne les résultats d'un croisement avec un gène adénine (*ad-20*) situé à l'extrémité droite du chromosome intéressé.

Tableau 4. Croisement *nic-2 ad-9* par *col*

	Ségrégation <i>nic</i> ⁺ / <i>nic</i> ⁻							
	<i>2nic</i> ⁺ <i>2nic</i> ⁻		<i>3nic</i> ⁺ <i>1 nic</i> ⁻				<i>4nic</i> ⁺	
	Tétrade	effectif	Tétrade	effectif	Tétrade	effectif	Tétrade	effectif
Pas de crossing-over décelé entre <i>col</i> et <i>ad-9</i> = DP	<i>col col</i> <i>nic ad</i> <i>nic ad</i>	51	<i>col col</i> <i>ad</i> <i>nic ad</i>	24			<i>col col</i> <i>ad</i> <i>ad</i>	4
2 crossing-over = DR	<i>col nic ad</i> <i>col nic ad</i> + +	0	<i>col ad</i> <i>col nic ad</i> + +	2			<i>col ad</i> <i>col ad</i> + +	1
Crossing-over décelé entre <i>col</i> & <i>ad-9</i> 1 crossing-over = Tétratypes	<i>col nic-2</i>							
	<i>nic ad</i> <i>col nic ad</i> <i>col</i> +	20	<i>ad</i> <i>col nic ad</i> <i>col</i> +	8	<i>nic ad</i> <i>col ad</i> <i>col</i> +	12	<i>ad</i> <i>col ad</i> <i>col</i> +	2
	<i>nic-2 ad-9</i>						<i>ad</i> + <i>col ad</i> <i>col</i>	
	<i>nic-ad</i> <i>nic</i> <i>col ad</i> <i>col</i>	6	<i>ad</i> <i>nic</i> <i>col ad</i> <i>col</i>	0	<i>nic ad</i> + <i>col ad</i> <i>col</i>			

Seuls les caractères mutants sont indiqués. Ce tableau tient compte de l'absence de spore de phénotype *col nic*, donc de l'ordre des gènes (*col nic-2 ad-9*) qui en découle. DP = tétrade ditype parentale, DR = tétrade ditype recombinée.

Il est important de remarquer que la ségrégation des gènes marqueurs utilisés est toujours normale. Par ailleurs les distances génétiques trouvées sont très comparables à celles décrites avant nous. En effet la distance *col ad-9* est ici de 21 U. C. O. (contre 20 sur la carte) et la distance *ad-9 ad-20* déterminée dans l'expérience du tableau 5 est de 13 U. C. O. (contre 15 sur la carte). La recombinaison n'est donc en rien modifiée par la présence du gène *nic-2*.

L'ordre des gènes est *col nic-2 ad-9*, puisque ce test "trois points" ne donne pas lieu à l'apparition d'individus *col nic-2*. Quand on veut plus précisément connaître la distance génétique entre *nic-2* et *ad-9*, la situation n'est pas simple et nous avons plusieurs possibilités. Tout d'abord, on peut ne tenir compte que des tétrades où la ségrégation est mendélienne pour le caractère *nic-2* (1ère colonne du Tableau 4): la distance *nic-2 ad-9* est alors d'environ 4 U. C. O.. Si l'on veut tenir compte de toutes les tétrades, il apparaît que pour 14 d'entre elles (3e et 4e lignes du Tableau 4) on ne peut déterminer l'emplacement exact du crossing-over, à cause de la ségrégation irrégulière du gène *nic-2*. En admettant, ce qui est peu probable, que toutes correspondent à un crossing-over entre *nic-2* et *ad-9*, la distance qui nous intéresse serait de 8 U. C. O.

De toutes façons, cette estimation maximale, de même que la précédente, place *nic-2* entre *ad-9* et le centromère, certainement dans une position très proche d'un gène arginine (*arg-3*). La localisation plus précise par rapport à *arg-3* est un travail relativement lourd qui est en cours d'exécution.

Tableau 5. Croisement de *nic-2 ad-9* par *ad-20*

La souche *nic-2 ad-9* est la même que celle utilisée dans le tableau n°4. Le gène *ad-20* (adénine) est sur le bras droit du chromosome II, à 29 unités de crossing-over du centromère. Seuls les caractères mutants sont indiqués.

Ségrégation <i>nic</i> ⁺ / <i>nic</i> ⁻			
<i>2nic</i> ⁺ <i>2nic</i> ⁻		<i>3nic</i> ⁺ <i>1 nic</i> ⁻	
Tétrade	effectif	Tétrade	effectif
<i>nic ad</i> <i>nic ad</i> <i>ad</i> <i>ad</i>	17	<i>ad</i> <i>nic ad</i> <i>ad</i> <i>ad</i>	10
<i>nic ad</i> <i>nic ad</i> <i>ad</i> +	10	<i>ad</i> <i>nic ad</i> <i>ad</i> +	2

Tableau 6. Comparaison entre les effectifs théoriques et expérimentaux des différents types de tétrades des croisements *nic-2 ad-9* × *col* et *nic-2 ad-9* × *ad-20*

	<i>2nic</i> ⁺ <i>2nic</i> ⁻		<i>3nic</i> ⁺ <i>1nic</i> ⁻ + <i>4nic</i> ⁺	
	effectif expérimental	effectif théorique	effectif expérimental	effectif théorique
<i>nic-2 ad-9</i> × <i>col</i>				
pas de crossingover détecté	51	46,6	28	32,4
au moins un crossing-over détecté	26	30,3	25	20,7
<i>nic-2 ad-9</i> × <i>ad-20</i>				
pas de crossing over détecté	17	18,7	10	8,3
au moins un crossing-over détecté	10	8,3	2	3,7

Le gène *nic-2* étant encadré par les 2 gènes *col* et *ad-9*, et la recombinaison sur le chromosome II non modifiée, intéressons nous à l'influence éventuelle de cette dernière sur la réversion.

Le Tableau 6 établit une comparaison entre les fréquences théoriques (s'il y a indépendance entre réversion et crossing-over) et expérimentales des différents types de tétrades où un crossingover a été ou non décelé. Dans le cas du croisement *nic-2 ad-9* × *col*, le X^2 d'homogénéité n'est pas significatif ($X^2 = 2,50$ — 3 degrés de liberté — probabilité 0,50). Ceci est une première manière de montrer que le crossing-over entre chromatides non soeurs n'affecte pas la réversion. Une deuxième manière est possible: pour 20 tétrades tétratypiques, nous savons si la réversion affecte une chromatide remaniée ou non par le crossing-over. On observe dans 8 cas que la réversion touche le gène *nic-2* d'une chromatide "parentale" (*col*⁺ *ad nic* → *col*⁺ *ad nic*⁺) et que dans 12 cas, c'est le gène *nic-2* d'une chromatide "non parentale" qui réverse (*col ad nic* → *col ad nic*⁺ ou *nic* → *nic*⁺).

Ces deux résultats permettent donc d'exclure que toute réversion soit sous la dépendance directe d'un crossing-over entre chromatides non soeurs. Cependant

on notera la convergence de trois faits expérimentaux qui, indépendamment les uns des autres, *ne sont pas statistiquement significatifs*. Tout d'abord la fréquence de tétrades anormales est légèrement supérieure quand on observe un crossing-over (49% contre 41% en moyenne). De plus, on a trouvé que, sur 20 chromatides, 12 ayant été remaniées ont subi la réversion, alors que 8 non remaniées ne la subissaient pas. Enfin les 3 tétrades où 2 crossing-over ont été décelés sont anormales (tableau 4, 2ème ligne). Il reste donc possible que la recombinaison affecte la réversion d'une façon indirecte ou encore qu'un même facteur influence les 2 phénomènes.

Le croisement *nic-2 ad-9* $\times$ *ad-20* complète l'étude de l'influence possible de la recombinaison sur la réversion.

Dans le croisement *nic-2 ad-9* $\times$ *col*, nous n'avions pas trouvé de tétrades anormales correspondant, à coup sûr, à un crossing-over entre *nic-2* et *ad-9*: aucune tétrade *ad, nic, col ad, col* n'a été décelée et les 12 tétrades *nic ad, col ad, col*, + peuvent provenir de tétrades *nic ad, (col ad nic $\rightarrow$ col ad nic⁺), col*, + ou de tétrades *nic ad, col ad, col, (nic $\rightarrow$ nic⁺)* correspondant au crossing over entre *nic* et *ad* que nous recherchons. On était donc en droit de se demander si un crossing over à droite de *nic-2* ne supprimait pas la réversion.

Le Tableau 5 montre clairement que la réversion peut avoir lieu quand un crossing over est advenu dans la région située après *ad-9*. De plus le tableau 6 montre qu'il n'existe pas de différence significative, dans cette expérience, entre effectifs théorique et expérimental des divers types de tétrades ($X^2: 2,20$ 3 degrés de liberté — probabilité 0,50). Donc il est probable que l'absence des tétrades signalée plus haut n'est due qu'à une observation trop limitée.

Etude d'un croisement mutant par mutant

Les résultats présentés jusqu'ici nous ont amenés à étudier la descendance d'un croisement *nic-2 iso2 A-2 B-1* $\times$ *nic-2 iso2 A-1 B-2*. On notera que le dicaryon ainsi formé ne se développe pas sur milieu minimum. Le Tableau 7 donne les

Tableau 7. *Tétrades obtenues dans le croisement nic-2 iso2 A-2 B-1 $\times$ nic-2 iso2 A-1 B-2*

	Types des tétrades				
	<i>4nic⁻</i>	<i>3nic⁻ 1nic⁺</i>	<i>2nic⁻ 2nic⁺</i>	<i>1nic⁻ 3nic⁺</i>	<i>4nic⁺</i>
1ère série	7	7	2	4	0
2ème série	5	7	4	2	0
Total	12	14	6	6	0
Distribution théorique	10,2	15,8	9,2	2,3	0,20

résultats, analysés en tétrades, de deux séries indépendantes de carpophores. Un nombre très important de tétrades possède 1, 2 ou même 3 individus sauvages. La réversion dans ce croisement est de 29%. On voit qu'il n'existe pas de différence significative entre la distribution expérimentale des différents types de tétrades et la distribution théorique obtenue en admettant que chaque chromatide est indépendamment susceptible de subir un événement réversion ($X^2 = 4,85$

calculé sur les quatre classes ayant une existence expérimentale (3 degrés de liberté — probabilité 0,20).

Il est intéressant de s'arrêter sur le cas des tétrades à 3 individus sauvages. Leur existence rend difficilement soutenable une hypothèse de crossing-over inégal analogue à celle invoquée dans le cas des individus sauvages, issus d'un croisement homozygote *Bar* × *Bar* chez la drosophile (Starkey, 1927), mutant par mutant chez la levure (Magni, 1963) ou chez *Neurospora* (Bauson, 1965). En plus d'un crossing over entre chaque paire de chromatides sœurs, il faudrait en effet imaginer un crossing-over supplémentaire *entre chromatides non sœurs*. Aussi bien devrait-on dans les expériences décrites plus haut noter une influence nette de la recombinaison réciproque sur la réversion, ce qui n'a pas été trouvé, nous l'avons vu.

Il est évident que l'existence de tétrades à 4*nic*⁺ dans ce croisement exclurait définitivement cette hypothèse, mais, pour avoir des chances de les obtenir, il faudrait analyser un nombre très important de tétrades. Il ne nous a pas paru nécessaire d'entreprendre ce travail, puisqu'il semble très improbable qu'il faille chercher une explication de la réversion, impliquant directement la recombinaison réciproque.

Conclusion

Les expériences que nous avons décrites permettent d'exclure que le caractère *nic-2* soit dû à la mutation d'un gène constitutif en un allèle inductible ou à la mutation simultanée de plusieurs gènes. L'analyse de la recombinaison réciproque et du croisement mutant par mutant permettent d'affirmer que la réversion n'est pas sous le contrôle direct du crossing-over.

Les résultats présentés ici sont trop préliminaires pour permettre d'envisager autre chose qu'une hypothèse de travail, mais il semble clair que la réversion à haute fréquence observée est une propriété autonome du gène *nic-2*.

Le cas de ségrégation anormale que nous présentons est remarquable par la fréquence élevée avec laquelle se produit le phénomène. C'est à notre connaissance, le premier cas aussi clair décrit chez des organismes eucaryotiques à phase haploïde végétative. Mais on peut se demander si ce genre de situation n'est pas moins rare qu'on pourrait le croire. En nous limitant au Coprin, deux cas pouvant se rapprocher du nôtre ont été découverts précédemment (Prud'Homme Communication personnelle). Ils concernent une irrégularité de ségrégation de deux gènes mutés *br* et *ne* situés sur le chromosome IV du Coprin. Ces irrégularités n'ont pas fait l'objet d'une étude aussi détaillée que celle rapportée ici; en effet, d'une part, les gènes mutés en cause gouvernant des caractères morphologiques, il n'a pas été possible d'obtenir des fructifications dans les croisements mutant par mutant (*br* × *br* ou *ne* × *ne*); d'autre part, la fréquence des tétrades anormales dans les croisements mutant par sauvage était, pour le gène *ne*, relativement faible (5%).

Il est inutile d'insister sur l'intérêt et le pouvoir de résolution génétique possible chez un champignon, que ce soit en étudiant les spores en masse ou en tétrades. Notons seulement l'intérêt d'une caractéristique biologique du Coprin pour analyser le phénomène étudié: ce Basidiomycète possède une phase végétative dicaryotique très stable néanmoins susceptible d'être artificiellement résolue en ses constituants haploïdes. Cela doit nous permettre de mettre à l'épreuve

Réversion à haute fréquence d'un gène nicotinique moins chez le *Coprinus radiatus*

d'expériences, des hypothèses sur la nature cytoplasmique éventuelle de l'agent conduisant à la réversion du gène étudié.

Remerciements. Mademoiselle Michèle Masson et Madame Monique Schmaltz, m'ont assisté très efficacement dans la réalisation de ce travail. Je les en remercie vivement.

Références

- Bausum, H. T., Wagner R. P.: "Selfing" and other forms of aberrant recombination in isoleucine-valine mutants of *Neurospora*. *Genetics* **51**, 815/830 (1965).
- Brink, R. A., Styles, E. D., Axtell, J. D.: Paramutation: directed genetic change. *Science* **159**, 161/170 (1968).
- Demerec, M.: Selfers mutants of *Salmonella typhimurium*. *Genetics* **48**, 1519—1531 (1963).
— Unstable genes in *Drosophila*. *Cold Spr. Harb. Symp. quant. Biol.* **2**, 145 (1963).
- Green, M. M.: The Genetics of an unstable gene at the white locus of *Drosophila melanogaster*. *Genetics* **56**, 467—482 (1967).
- Guerdoux, J. L.: Induction de la cynuréninase par la cynurénine, les tryptophane et 5 methyl tryptophane chez le *Coprinus radiatus*. *C. R. Acad. Sci. (Paris)* **265**, 681—684 (1967).
- Magni, G. E.: Origin and nature of spontaneous mutations in meiotic organisms. *J. cell. comp. Physiol., Suppl.* 1 au vol. **64**, No. 2, 165—171 (1964).
- McClintock, B.: The origin and behavior of mutable loci in maize *Proc. nat. Acad. Sci (Wash.)* **36**, 344—355 (1950).
- Prevost, G.: Etude Génétique d'un Basidiomycète: *Coprinus radiatus* Fr. Ex. Bolt. Thèse Paris (1962)
- Prud'Homme, N.: Communication personnelle.
- Sturtevant, A. M.: A further study of the so-called mutation at the Bar locus of *Drosophila*. *Genetics* **12**, 401 (1927).
- Whitehouse, H. L. K., Hastings, H. P. J.: the analysis of genetic recombination on the polaron hybrid DNA model. *Genet. Res.* **6**, 27 (1965).

Communicated by G. E. Magni

J. L. Guerdoux
Centre de génétique moléculaire
91 Gif-sur-Yvette/France

A R T I C L E 2

Modifications de la haute fréquence de réversion du mutant *nic-2* chez le *Coprinus radiatus*

1. Mise en évidence de trois types de souches, donnant une réversion plus ou moins élevée

J. L. GUERDOUX

Centre de Génétique Moléculaire du C.N.R.S. — Gif sur Yvette (91)
 Faculté des Sciences d'Orsay — Orsay (91)

Reçu Decembre 12, 1970

Modifications of the High Frequency of Reversion of a Nicotinic Two Mutant

1. Evidence for the Existence of Three Kinds of Strains, with More or Less Important Reversion Frequencies

Summary. In *Coprinus radiatus*, a cross homozygous for *nic-2* mutation yields two types of *nic*-strains. The first one (*nic-2F*) retains the character of the original mutant, reverting at meiosis with a frequency of 20 to 30%. All crosses with the second type (*nic-2fa*) show a sharply reduced reversion rate.

The analysis of the progeny of crosses involving a *nic-2fa* strain show the appearance of a third type of strains (*nic-2fn*). The reversion of *nic-2fn* strain is low, but this character is not imposed to the partner in a cross with a *nic-2F* strain.

Le mutant nicotinique deux (*nic-2*) obtenu après action mutagène de l'acide nitreux sur la souche sauvage du Basidiomycète *Coprinus radiatus*, est parfaitement stable en phase végétative. A la méiose, au contraire, il reverse avec une fréquence très élevée de l'ordre de 20 à 30%. Cet événement se produit aussi bien lors d'un croisement *nic* × + (on observe alors des tétrades à 2, 3 ou 4 sauvages) que lors d'un croisement homozygote *nic-2* × *nic-2* où nous avons rencontré des tétrades comportant jusqu'à 3 sauvages.

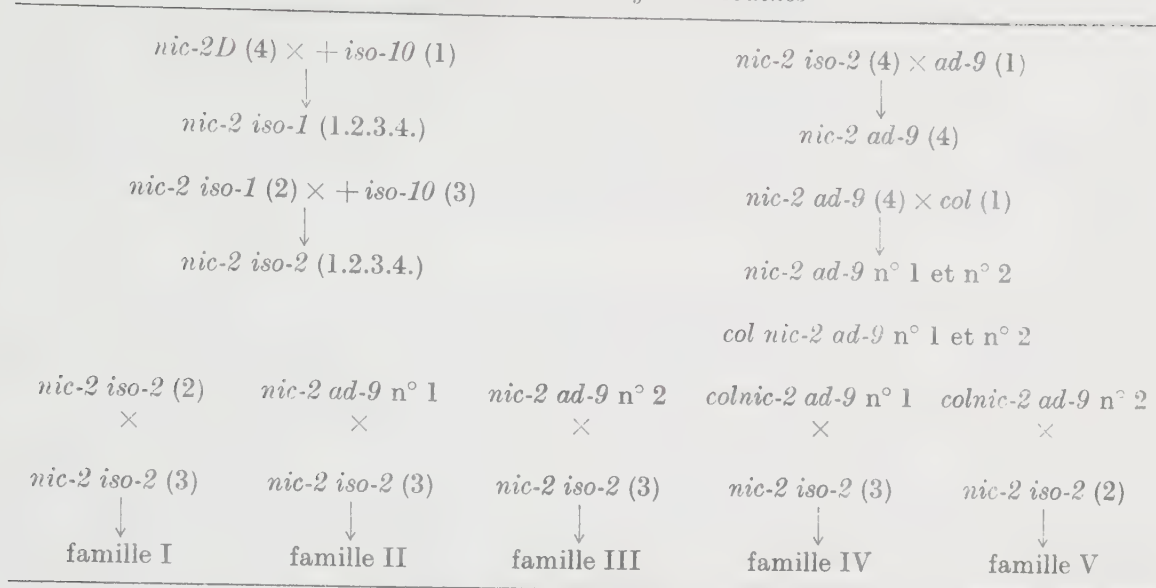
Dans un article précédent (Guerdoux, 1969), nous avons montré que ni l'induction enzymatique ni la mutation simultanée de plusieurs gènes, ni le crossing over oblique ne permettait d'expliquer une fréquence aussi élevée de sauvages « illégitimes », que rien ne semble distinguer de la souche sauvage de référence.

La fréquence de réversion observée sur un petit nombre de croisements était apparue comme relativement stable. Lors de l'analyse de nouveaux et nombreux croisements, nous avons découvert qu'existaient parfois des fréquences de réversions nettement inférieures à celles tout d'abord observées. Nous allons voir que les variations de la fréquence de réversion ne sont pas aléatoires mais obéissent à des « règles » que nous énoncerons au fur et à mesure de la description des expériences.

Matériel et méthodes

Souches

Les techniques utilisées et les caractéristiques des différentes souches ont été décrites précédemment (Guerdoux, 1969).

Tableau 1. *Généalogie des souches*

nic-2D = nicotinique deux, souche de départ. *nic-2 iso-1*, *iso-2* = nicotinique deux, iso-génisé 1 ou 2 fois avec la souche + *iso-10*. + *iso-10* = souche sauvage de référence, 10 fois isogénisée. 1 = *A-1 B-1*; 2 = *A-2 B-1*; 3 = *A-1 B-2*; 4 = *A-2 B-2* groupes d'incompatibilité

Rappelons néanmoins que la mutation conduisant à un besoin en acide nicotinique a pu être localisée sur le chromosome II du Coprin. Deux gènes marqueurs l'empruntent: il s'agit de *col* (mutation coloniale), situé sur le bras chromosomique gauche, à 6 unités de crossing over du centromère, et de *ad-9* (mutation conduisant à une exigence en adénine) qui est à 14 unités de crossing over du centromère, sur le bras droit du chromosome. *nic-2* est entre *ad-9* et le centromère, à environ 10 unités de crossing over de ce dernier.

Toutes les souches utilisées dérivent du mutant *nic-2* isolé dans le laboratoire et isogénisé deux fois (*nic-2 iso-2*). Une généalogie partielle en est donnée dans le tableau n° 1. On a appelé « famille » un ensemble de souches issus d'un croisement homozygote *nic-2* $\times$ *nic-2*, succédant à des croisements *nic-2* $\times$ *nic-2*⁺.

Par commodité, les groupes d'incompatibilité sont respectivement notés (1) pour *A-1 B-1*, (2) pour *A-2 B-1*, (3) pour *A-1 B-2*, (4) pour *A-2 B-2* (Prevost, 1962).

Mesure de la fréquence de réversion

La fréquence de réversion peut être évaluée sur des spores issues de tétrades que l'on numérote dans l'ordre de leur prélèvement sur les basides, leurs 4 spores étant respectivement notées a, b, c et d. Elle est alors très précise si un grand nombre de tétrades est étudié.

Le pourcentage de germination est déterminé sans ambiguïté, et comme il est souvent très grand, on ne peut être gêné par des germinations différentielles propres aux divers génotypes.

Etant donné l'importance du travail expérimental qu'elle nécessite, l'analyse de tétrades n'a été utilisée que lorsqu'on a souhaité connaître la répartition des sauvages dans les tétrades d'un croisement homozygote mutant, et pour les croisements entre individus mutants et la souche: c'est dans ce cas la seule méthode permettant de connaître précisément la réversion.

L'analyse des spores une à une est une technique déjà moins lourde. Elle est précise et peut être utilisée sans inconvénient puisque l'on garde les informations propres aux germinations.

La majorité des croisements étudiés ici sont homozygotes mutants: il est donc possible de connaître la réversion par un simple étalement des spores sur milieu sans acide nicotinique.

Cette technique est nettement plus rapide que les précédentes mais il est alors difficile d'estimer la germination. En effet les spores de Coprin adhèrent plus ou moins aux pipettes

Le mutant *nic-2* chez le *Coprinus radiatus*

et un nombre indéterminé en est perdu lors des dilutions nécessaires. En général, on retrouve de 20 à 60% du nombre de spores théorique. Le déficit enregistré peut être dû à la perte de spores décrite plus haut, mais également à une germination inférieure à 100%. Néanmoins, comme on n'a tenu compte que des résultats où l'on a retrouvé au moins 20% du nombre de spores théoriques, la germination est donc toujours au moins égale à cette valeur et très probablement supérieure. Il est néanmoins évident qu'existe là une source éventuelle de variabilité dans l'estimation des fréquences de réversions. Cette estimation peut en effet être faussée par des viabilités différentes des spores *nic⁻* et *nic⁺*: signalons toutefois que nous n'avons pas rencontré d'ennuis de ce type lors des analyses en tétrades ou en spores repiquées une à une.

Dans nos premières expériences, à partir d'une suspension mère de spores dont le nombre était compté à l'hématimètre, une suspension de 1 000 spores par ml et une suspension à 2 500 spores par ml étaient faites. 0,2 ml de ces suspensions étaient étalées respectivement sur milieu minimum et sur milieu supplémenté en acide nicotinique.

La dilution nécessaire entre les deux suspensions de spores était le premier inconvénient de cette technique (dite technique 1). D'autre part, le nombre de colonies à compter sur les boîtes était assez grand (jusqu'à 200). Nous avons par la suite préféré étaler, à partir d'une seule suspension à 1 000 spores par ml, 0,2 ml sur milieu minimum et 0,05 ml sur milieu additionné d'acide nicotinique. La dilution supplémentaire est supprimée et le nombre de colonies à compter moins grand. Il est clair qu'à cause de cette réduction du nombre de colonies comptées, la variabilité des résultats sera plus grande. Cette technique (dite technique 2) a néanmoins été utilisée car c'est elle qui permet d'analyser le plus grand nombre de croisements dans un temps relativement court.

La méthode d'analyse utilisée (tétrades, spores repiquées une à une, sporées en masse par technique 1 ou 2) sera signalée dans chacun des tableaux de résultats.

Expression des résultats

Lorsqu'il s'agit de réversions importantes elles sont généralement exprimées en pourcentages. Cependant, les comptages permettant de donner un résultat chiffré n'ont pas toujours été faits; on s'est parfois contenté d'estimer la réversion comme étant élevée (notée E dans les tableaux) en observant que, grossièrement, il y avait autant de colonies sur milieu minimum que sur milieu additionné d'acide nicotinique (d'après la technique utilisée une telle égalité, réellement trouvée, donne une réversion de 25%). Lorsque les réversions sont faibles ou nulles, on donne le résultat expérimental brut: à savoir, d'une part le nombre de colonies observées sur milieu minimum, d'autre part le nombre de spores viables théoriquement étalées, évalué d'après le nombre de colonies se développant sur milieu additionné d'acide nicotinique, compte tenu des dilutions réalisées.

Calcul des moyennes

[L'erreur entachant chaque résultat n'a pas été mesurée, et l'on s'est contenté de conserver les résultats où les effectifs de colonies poussant sur des boîtes de Pétri différentes n'étaient pas trop dissemblables (3 boîtes dans le cas de la technique 1, 2 boîtes dans celui de la technique 2).

Nous n'avons pas fait intervenir dans ces calculs le nombre d'individus comptés sur les boîtes. Cette pondération n'avait en effet pas beaucoup d'intérêt puisque les effectifs sont toujours compris entre 10 et 50 colonies par boîte (technique 2) entre 40 et 200 (technique 1).

Terminologie

Les termes classiques de génétique sont utilisés ici. Il n'en reste pas moins que le phénomène décrit pose des difficultés de vocabulaire voisines de celles rencontrées par Brinck parlant de la paramutation chez le maïs: «les termes <gène> <facteur> et <allèle> sont utilisés dans le sens d'unités fonctionnelles dans le développement. L'observation de la paramutation, naturellement, doit faire envisager des questions de base sur la signification de ces expressions au niveau de l'organisation du chromosome» (Brinck, 1958).

J. L. Guerdoux:

Tableau 2. Répétition de la mesure de la réversion de sporées de différents croisements

n° du croisement	1ère estimation	2ème estimation	Moyenne partielle
211	19	—	—
212	20	38	29
213	24	13	18,5
214	27	—	—
215	23	21	22
216	18	27	22,5
217	0/1000	0/6500	—
220	25	35	30
221	29	24	26,5
222	30	20	25
223	48	32	40
224	15	27	21
225	38	36	37
226	24	—	—

Les croisements étudiés sont entre des souches mutantes issues de *ad-9 nic-2* $\times$ *col* et les souches *nic-2 iso-2* compatibles. Les familles II—III—IV—V, dont il est question dans le tableau n° 1, sont respectivement issues des croisements 211, 212, 220 et 221. La technique n° 1 a été utilisée.

Résultats expérimentaux

Réversions fortes et faibles

Les données expérimentales que nous possédions sur des tétrades (voir article précédent), montraient que la réversion n'était pas très différente d'un croisement à un autre: les fréquences de réversions observées étaient de 0,15 pour 68 individus étudiés lors de l'isogénisation, de 0,34 pour 86 individus analysés dans des back-crosses, de 0,22 pour 326 souches issues de croisements avec des gènes marqueurs, et de 0,25 pour 152 souches venant d'un croisement homozygote *nic-2 iso-2* (2) $\times$ *nic-2 iso-2* (3). La fréquence de germination étant très élevée (souvent supérieure à 90%) la différence éventuelle de viabilité des divers génotypes est négligeable, ce qui permet de n'étudier que les tétrades dont les 4 individus ont germés. Dans ces conditions, la fréquence moyenne de réversion de 0,236 que l'on observe doit donc être une bonne estimation.

Nous avons ensuite analysé la réversion en étalant les sporées en masse (technique 1).

Le tableau n° 2 donne les fréquences de réversions de croisements entre individus mutants issus du croisement *ad-9 nic-2* $\times$ *col* (voir tableau 1), et souches *nic-2 iso-2* compatibles. Deux estimations indépendantes ont été faites.

Le test de Fisher appliqué à ces résultats (abstraction faite du croisement 217) montre qu'ils ne présentent pas de différence statistiquement significative (z observé = 0,0835, z limite au seuil de 5% étant de 0,28).

D'autre part, 17 sporées indépendantes d'un même croisement [*nic-2 iso-2* (2) $\times$ *nic-2 iso-2* (3)] ont été analysées: les réversions observées varient de 0,14 à 0,52, leur moyenne étant de $0,31 \pm 0,088$.

La variabilité que l'on note d'un croisement à un autre n'est pas statistiquement différente de celle observée lorsque l'on mesure deux fois la réversion d'une même sporée ou lorsque l'on étudie la réversion de différentes sporées du même

Tableau 3. Croisements entre souches issues de *nic-2 iso-2* (2) $\times$ *nic-2 iso-2* (3) et les souches *nic-2 iso-2* compatibles: réversions observées parfois faibles

n° de la souche		29	63	64	88	9	17	20	85
Réversion	1ère sporée	25	3/300 25	E	1/500	0/300 0/200	0/300 0/400	0/1000 0/400	6
1er dicaryon	2ème sporée	2/200 10	8	0/500	E	2/200	5/250	0/380	4/250 1/500
Réversion	1ère sporée	—	—	15	—	E	15	15	12
2ème dicaryon	2ème sporée	—	—	15	—	11	14	28	—

croisement. Nous pouvons donc considérer que toutes les réversions étudiées sont identiques et ceci quelque soit le génotype du croisement.

Par contre, l'ordre de grandeur de la réversion du croisement 217 est tout autre. Un phénomène aussi tranché méritait une étude plus approfondie. Nous l'avons entreprise en recherchant systématiquement des croisements à faible réversion.

Faibles réversions accidentelles et permanentes

Les spores d'une série de 22 tétrades issues d'un croisement *nic-2 iso-2* (2) $\times$ *nic-2 iso-2* (3) ont été étudiées (la fréquence de réversion dans ces tétrades était de 0,16).

Les 74 spores *nic*⁻ ont été croisées avec les souches *nic-2 iso-2* de signe compatible. 63 descendance ont été obtenues une ou plusieurs fois.

Les fréquences de réversions de 54 de ces descendance dont on a analysé une (32 croisements) ou deux sporées issues d'un même dicaryon (22 croisements), sont comprises entre 0,053 et 0,41.

Toutes ces valeurs forment un tout homogène, de variabilité continue. Elles n'ont pas été comparées statistiquement aux valeurs précédemment obtenues, car la technique d'analyse n° 2 employée donne des résultats non directement comparables aux précédents, obtenus par la technique n° 1.

Des valeurs plus faibles ont été observées et consignées dans le tableau n° 3.

Le cas des croisements avec les souches 29 et 63 nous semble devoir être mis à part: les valeurs faibles trouvées ne se répètent pas lors d'une deuxième analyse de la sporée. Il est probable qu'elles ne sont dues qu'à des erreurs expérimentales.

Il n'est pas possible d'être certain de la réalité des faibles réversions trouvées dans le cas des souches 64 et 88, puisqu'elles n'ont pas été confirmées. Par contre, une explication triviale ne peut convenir dans le cas des croisements avec les souches 9, 17, 20, 85 d'une part et 82 d'autre part comme nous le verrons plus loin: la répétition de l'analyse montre que les valeurs faibles sont réelles.

5 croisements présentent donc la particularité du croisement 217, que nous avons décrit plus haut, de conduire à des réversions nettement inférieures à celles habituellement constatées. Nous nous sommes proposés d'étudier si ce caractère

était ou non une constante de ces croisements. Il est alors très vite apparu que les faibles réversions étaient à classer en deux groupes. Les faibles réversions observées avec les souches 9, 17, 20 et 85 ne peuvent être considérées comme une caractéristique du croisement: une seule sporée présente ce caractère dans le cas de la souche 85, un seul dicaryon semble conduire à des réversions faibles dans le cas des souches 9, 17 et 20 (le caractère exceptionnel de la faible réversion a été confirmé dans le cas de la souche 17: 4 sporées issues de 2 autres dicaryons avec *nic-2 iso-2* ont donné de fortes réversions).

Nous reviendrons lors de la discussion sur l'intérêt que présenterait l'étude de ces *faibles réversions accidentelles*. Elle n'a pas été approfondie ici. Notons cependant que le croisement 217 dont il a été question plus haut, peut être également rangé dans ces faibles réversions accidentelles; en effet, un deuxième dicaryon ayant été réalisé, la sporée obtenue a donné une réversion de 0,145. Signalons également que lors d'une analyse de tétrades du croisement *nic-2 iso-2* (2) $\times$ *nic-2 iso-2* (3) dont nous avons décrit 17 sporées donnant une forte réversion, nous avons rencontré une série de 25 tétrades, prélevées sur une même fructification, sans aucun individu sauvage. Nous rencontrerons, dans la suite des expériences, d'autres cas de ce type de faibles réversions non constamment observées dans un croisement donné.

Le cas du croisement entre *nic-2 iso-2* et la souche 82 est tout autre: il donne *toujours* des réversions faibles. Il en est ainsi de 22 sporées issues de quatre dicaryons différents, qui donnent peu de revertants (la valeur la plus élevée observée est de l'ordre de $2 \cdot 10^{-3}$, la plus faible notée étant de 0 revertant sur 20 500 spores). Il s'agit donc d'une caractéristique constante du croisement: c'est une *faible réversion permanente*.

Le comportement particulier de la souche 82 méritait une étude plus poussée, que nous allons décrire maintenant.

Définition des souches F et fa

On a croisé à des souches ayant donné une forte réversion avec *nic-2 iso-2* trois types d'individus. Les premiers (3—4—5—6) avaient également donné une forte réversion avec *nic-2 iso-2*; les seconds (9—17) avaient donné parfois une faible réversion; enfin la souche 82 avait toujours donné une réversion faible.

Les résultats (tableau 4) montrent que les croisements entre souches «soeurs» ayant donné de fortes réversions avec les souches *nic-2 iso-2* compatibles donnent de fortes réversions.

Les souches 9 et 17 ne montrent pas ici de caractéristique particulière: ceci renforce l'idée que la réversion faible observée dans les croisements avec *nic-2 iso-2* n'était qu'accidentelle.

Par contre, on voit que, quelque soit son partenaire, la souche 82 impose son caractère de faible réversion, que ce soit avec les souches 9 et 17 ou avec des souches ayant donné de fortes réversions avec *nic-2 iso-2*.

Ces résultats nous ont permis de proposer les deux définitions suivantes:

Les souches *nic-* qui, croisées entre elles, donnent de fortes réversions seront dites «fortes» (F): elles peuvent parfois donner une faible réversion, mais seulement d'une façon accidentelle.

Par contre, il suffit que dans un croisement soit impliquée une souche telle que 82 pour que la réversion soit faible: la souche sera dite «faible agressive» (fa).

Tableau 4. Croisements entre souches issues de *nic-2 iso-2* (2) $\times$ *nic-2 iso-2* (3)

n° des souches	Réversion	Diagnostic
3 $\times$ 5	15	souches <i>F</i>
3 $\times$ 15	18	
4 $\times$ 6	7	
4 $\times$ 24	9	
4 $\times$ 25	21	
5 $\times$ 8	Elevée	
5 $\times$ 14	20	
6 $\times$ 7	11	
6 $\times$ 22	38	
9 $\times$ 3	8	
9 $\times$ 14	7	82 souche <i>fa</i>
9 $\times$ 21	1/200, 12	
	6, 8, 15, 11	
17 $\times$ 6	9	
82 $\times$ 9	0/600	
82 $\times$ 17	0/400	
82 $\times$ 31	0/800	
82 $\times$ 33	0/440	
82 $\times$ 37	0/360	
82 $\times$ 54	0/1000	
82 $\times$ <i>ad⁻ nic F</i>	8/14000	

La technique n° 2 a été utilisée. Réversion « élevée »: voir matériel et méthodes.

La souche *ad⁻ nic F* sera décrite plus loin.

Ces règles ($F \times F \rightarrow$ une forte réversion, accidentellement une faible, $fa \times F \rightarrow$ toujours une faible réversion) ont pu être confirmées par l'étude d'autres descendance comportant des souches *fa* en plus grand nombre.

Généralisation des règles

Une série d'expériences a été faite avec des souches de plusieurs origines (voir tableau 1). 13 souches de la famille I, 11 souches de la famille II, 13 souches de la famille III, 12 souches de la famille IV, 13 souches de la famille V, ont été croisées avec les souches *nic-2 iso-2* compatibles.

La majorité (52) des croisements donne de fortes réversions, mais les 10 autres donnent de faibles réversions, et l'on peut suspecter les souches 1b, 3a, 8b (famille I), 8 (famille II), 15 (famille III), 1, 5 et 8 (famille V) d'être *fa*.

Si les règles énoncées plus haut sont correctes, on s'attend à ce que les croisements entre souches *fa* et souches *F* (déterminées comme telles en première approximation) donnent de faibles réversions. Le tableau 5 donne les résultats de cette expérience. Le caractère *fa* est confirmé pour les souches I.1b et I.8b (finalement impliquées dans trois croisements à faible réversion, avec un partenaire considéré comme *F:nic-2 iso-2*, I.1a, I.9b donnant par ailleurs de fortes réversions).

J. L. Guerdoux:

Tableau 5. *Croisements de souches de plusieurs origines, entre elles: détermination des fa*

1ère souche		2ème souche		Réversion observée	Conclusion
numéro	premier diagnostic	numéro	premier diagnostic		
I.1 b	<i>fa</i> ?	I.1 a	<i>F</i>	1/530	
		I.9 b	<i>F</i>	1/200	I.1 b, <i>fa</i>
I.3 a	<i>fa</i> ?	I.9 d	<i>F</i>	5/3 000	I.3 a, <i>fa</i>
I.8 b	<i>fa</i> ?	I.1 a	<i>F</i>	0/1 400	
		I.9 b	<i>F</i>	0/1 500	I.8 b, <i>fa</i>
III.8	<i>fa</i> ?	III.40	<i>F</i>	1/100	III.8, <i>fa</i>
IV.15	<i>fa</i> ?	IV.1	<i>F</i>	1/120	IV.15, <i>fa</i>
V.5	<i>fa</i> ?	V.15	<i>F</i>	0/330	V.5, <i>fa</i>
V.8	<i>fa</i> ?	V.30	<i>F</i>	1/160	V.8, <i>fa</i>
I.3 b	—	I.1 a	<i>F</i>	0/400	I.3 b, <i>fa</i> ?
		I.3 c	—	1/1 000	
I.5 a	—	I.5 d	<i>F</i>	11/24 000	I.5 a, <i>fa</i> ?

La technique n° 1 a été utilisée.

Tableau 6. *Croisements entre souches F de plusieurs origines*

1ère souche		2ème souche		Réversion observée	Conclusion
numéro	premier diagnostic	numéro	premier diagnostic		
I.9 d	<i>F</i>	I.13 b	<i>F</i>	14	$nic-2 F \times nic-2 F$ ↓ réversion élevée
		I.15 d		22	
II.5	<i>F</i>	II.18	<i>F</i>	35	
III.16	<i>F</i>	III.34	<i>F</i>	25	
IV.5	<i>F</i>	III.43	<i>F</i>	27	
III.5	<i>F</i>	III.13	<i>F</i>	29	
III.18	<i>F</i>	III.19	<i>F</i>	17	
IV.3	<i>F</i>	IV.67	<i>F</i>	12	
IV.19	<i>F</i>	IV.23	<i>F</i>	28	
V.3	<i>F</i>	V.9	<i>F</i>	13	
I.1 a	<i>F</i>	I.15 d	<i>F</i>	0/8 000*	$nic-2 F \times nic-2 F$ ↓ faible réversion accidentelle
II.12	<i>F</i>	II.31	<i>F</i>	1/500*	
V.1	<i>fa</i> ?*	V.19	<i>F</i>	22	

La technique n° 1 a été utilisée. Les trois croisements donnant des résultats non orthodoxes sont marqués d'un astérisque.

D'autres souches sont impliquées dans deux croisements, avec des souches *F* et donnent de faibles réversions. Il s'agit de I.3 a (avec *nic-2 iso-2* et la spore I.9 d), de la spore 15 de la famille IV (avec *nic-2 iso-2* et la spore 1), de la spore 5 de la famille V (avec *nic-2 iso-2* et la spore 15 de la même famille). Ces 5 souches sont également à considérer comme *fa*.

Le mutant *nic-2* chez le *Coprinus radiatus*Tableau 7. *Dénombrement des diverses situations observées*

Famille	Souches <i>F</i>	Souches <i>fa</i> certaines		Souches <i>fa</i> possibles	Faibles réversions accidentelles
		nombre	%		
I, 1ère série	62	1	0,04—8,7	0	4
I, 2ème série	11	3	5,3—55	4	1
II	11	0	0—28	0	1
III	12	1	0,2—47	0	0
IV	11	1	0,2—42	0	0
V	10	2	2,2—50	1	0
Total	116	8	2,7—12	5	6

On donne les intervalles de confiance, au seuil de 5%, pour les pourcentages de *fa* certaines, pour montrer qu'ils ne peuvent être considérés comme statistiquement différents.

Les souches 3b, 3d, 5a et 13a de la famille I et la souche I de la famille V sont impliquées dans un croisement à faible réversion soit avec *nic-2 iso-2* (I.3d, I.5a et I.13a) soit avec une souche issue de la même génération (I.3b, I.5d et V.1). Le caractère *fa* n'est pas certain puisque nous avons vu des cas de faibles réversions non reproductibles.

Pour cette même raison, il n'est pas étonnant de trouver quelques exceptions à la règle $F \times F \rightarrow$ réversion forte. Dans le tableau 6 sont notés les résultats de tels croisements et l'on relève 3 exceptions: I.15d et I.1a, qui croisées avec *nic-2 iso-2* donnent de fortes réversions, donnent ensemble une réversion faible. Par contre, la spore V.1, qui croisées avec *nic-2 iso-2* donnait une réversion faible, croisées ici avec V.19 donne une réversion forte. Les croisements n'ont pas été répétés, les souches n'ayant pas été toutes conservées: une ambiguïté subsiste donc sur le caractère accidentel de ces faibles réversions.

Il n'en reste pas moins que la grande majorité des résultats des croisements étudiés obéissent aux règles proposées, et que les particularités de la souche n° 82 sont observées dans d'autres cas (I.1b, I.8b, I.3b. III—8, IV—15, V—5 et V—8).

Dans la descendance d'un croisement $nic^- \times nic^-$, existent donc deux sortes de souches, *F* et *fa*, celles-ci imposant une faible réversion aux premières.

Lois d'apparition des souches fa

Le gène *nic-2F* étant soumis à des variations de deux types, la réversion et la transformation en *fa*, il était tentant de chercher un lien entre ces deux phénomènes.

Le tableau n° 7 résume ce qui a été décrit précédemment. On a calculé, à partir de la loi binomiale, les intervalles de confiance (avec un coefficient de sécurité de 95%) des pourcentages de *fa* trouvés dans les différentes expériences. On note alors qu'il n'y a pas de différence significative: on admettra donc que l'on trouve, en moyenne, 6% de souches *fa*. Il est probable que la fréquence réelle est légèrement supérieure puisque des *fa*, dites possibles, auraient pu se révéler certaines, si elles avaient été analysées plus avant.

Il est évident qu'il est difficile d'être certain, sur la base des résultats présentés, que la fréquence des *fa* est ou non différente de celle des sauvages illégitimes.

Tableau 8. *Ségrégations quasi régulières de nic-2 fa × nic-2*

Souche <i>nic</i> ⁻	Souche sauvage	Tétrades		Souche <i>nic</i> ⁻	Souche sauvage	Tétrades	
		2/2	3/1 et 4/0			2/2	3/1 et 4/0
I.1b ^b	(-) 8d	29	0	I-9 ^c	+ <i>iso-10</i> (+) n°10 (+) n°11 (+) n°30	4 6 4 2	0 7 2 0
I.82 ^b	+ <i>iso-10</i> (+) n°10 (+) n°11 (+) n°30 (+) n°37 (+) n°67	34 ^a 28 24 22 15 14	0 0 1 0 0 1	I.17 ^c	+ <i>iso-10</i> (+) n°1 (+) n°18 (+) n°27 (+) n°59 (+) n°60 (+) n°81	3 3 3 9 6 3 7	2 4 2 8 2 4 4
I-13a ^b	+ <i>iso-10</i>	13	1	<i>nic-2 iso-2</i>	+ <i>iso-10</i> (+) n°10 (+) n°11	14 13 5	12 7 6

^a Somme des résultats de deux séries de tétrades indépendantes.

^b Les souches I-82 et I-1b sont *fa*. La souche I-13a l'est peut-être.

^c Les souches I-9 et I-17 étaient impliquées dans un croisement à faible reversion accidentelle.

Les souches sauvages sont respectivement notées + *iso-10* pour la souche sauvage de référence, et (+) n°... pour les sauvages illégitimes.

Un rapport direct a donc été recherché entre l'apparition de *fa* et de sauvages illégitimes.

Nous avons étudié des souches issues de tétrades dans la famille I. Ainsi nous savons que la souche I.1b était issue d'une tétrade sans individu sauvage. Il en est de même pour la souche I.3a. La spore I.82 faisait partie d'une tétrade avec un individu sauvage et I.8b voisinait avec 2 individus « réversés ». L'apparition de *fa* n'est donc pas un événement réciproque de celle de sauvages (cas de I.1b et I.3a). A l'inverse, l'apparition de sauvages dans une tétrade n'empêche pas celle de *fa* (cas de I.82 et I.8b).

La réversion et l'apparition de *fa* n'ont donc pas d'influence directe l'une sur l'autre.

Il existe des *fa* également dans les familles de spores dont l'un des parents au moins, a un chromosome II remanié. Le tableau n° 1 montre que les familles II, III, IV et V proviennent de croisements entre souches issues de *nic-2 ad-9 × col* et souches *nic-2 iso-2* compatibles.

Il est donc certain que des remaniements du chromosome II porteur de la mutation *nic-2* originelle ont eu lieu dans le premier génome. Il y en eu au moins un pour les souches *ad-9 nic-2* (familles II et III), au moins deux pour les souches *col nic ad* (famille IV et V). Cela n'empêche pas l'apparition de *fa* lorsque l'on croise ces souches avec *nic-2 iso-2*. Il est même très probable que l'« allèle » *fa* provienne du chromosome remanié dans le cas de la spore 8 de la famille V, car

celle-ci a un génotype *col nic ad*. Par contre, des souches *fa* des familles IV et V sont de génotype *nic ad*⁺ (donc pouvant provenir du chromosome II originel): il ne semble donc pas que l'apparition de *fa* soit à mettre en rapport avec la stabilité du chromosome porteur de la mutation *nic-2*.

La transformation de *F* en *fa* est donc indépendante de l'apparition de sauvage illégitime et, pas plus que cette dernière (voir article précédent) ne semble en rapport direct avec la recombinaison. Nous allons maintenant voir que le caractère « faible réversion », se manifeste en présence d'un allèle sauvage.

Croisements entre souches fa et sauvages

Le croisement de souches *nic F* (*nic-2 iso-2*) par *+ iso-10* donne naissance à des tétrades *2nic*⁺ *2nic*⁻ mais aussi à des tétrades avec 3 ou même 4 sauvages (Guerdoux, 1969). Ceci a été rencontré dans de nombreux croisements, que le sauvage impliqué soit la souche de référence ou des sauvages « illégitimes » issus de croisements *nic-2 iso-2* × *nic-2 iso-2*.

Nous avons réalisé des croisements de souches *fa* avec des sauvages de ces deux types. Les résultats sont consignés dans le tableau 8, qui comporte également les résultats obtenus en croisant ces mêmes sauvages soit avec *nic-2 iso-2* (*F*), soit avec des souches *nic*⁻ impliquées dans de faibles réversions accidentelles.

Les souches I.9 et I.17, par exemple, se comportent ici comme *nic-2 iso-2*, à savoir donc, comme des souches *F*. Ceci est encore en faveur du caractère accidentel des faibles réversions parfois observées.

Il n'y a apparemment pas de différence entre les croisements avec des sauvages illégitimes ou *+ iso-10*, puisque l'on trouve dans les croisements avec *fa*, 47 tétrades 2:2 et une tétrade 3:1 quand le sauvage est *+ iso-10*, 132 tétrades 2:2 et 2 tétrades 3:1 quand ce sauvage est à ranger parmi les illégitimes. Ceci est un nouvel argument quant à leur identité.

Lorsque la souche *nic*⁻ utilisée est *fa* (c'est certain pour I.82 et I.1 b; probable pour I.13a) une majorité de tétrades 2:2 est trouvée et seules trois tétrades 3⁺ 1⁻ ont été observées sur un total de 182 étudiées. La présence du génome sauvage ne change donc rien au caractère « faible réversion ».

Étude de la descendance de croisements impliquant une souche fa:

Définition du type fn

Dans l'hypothèse où les souches *fa* et *F* ne diffèrent que par un couple d'allèles classiques, on doit retrouver autant d'individus *fa* que d'individus *F* après un croisement entre ces deux souches. Nous avons croisé des souches issues de *fa* (I.1 b) × *F* (*nic-2 iso-2*) entre elles et avec *nic-2 iso-2*. Le résultat est donné dans la première partie du tableau 9. Les fréquences de réversions des croisements avec *nic-2 iso-2* de 15 souches sont comprises entre 0,054 et 0,21. Aucune d'entre elles n'est donc assimilable aux faibles réversions dues à la présence de *fa*. La valeur moyenne observée ($0,10 \pm 0,0415$) est cependant notablement inférieure aux réversions fortes observées habituellement par la technique utilisée ($0,279 \pm 0,108$).

D'autre part, les croisements entre elles des souches issues de *F* × *fa*, donnent des fréquences de réversions de l'ordre de 1 à 2%. On peut donc faire l'hypothèse

Tableau 9. *Étude des descendants de croisements impliquant une souche fa*

Croisement d'origine	Réversions observées		
	entre eux ^b	1er P ^a × <i>nic-2 iso-2</i>	2 ^e me P ^a × <i>nic-2 iso-2</i>
<i>fa</i> × <i>F</i> ^c	2	8,1	11
—	—	10	—
—	—	—	9,3
1	6,6	—	8,4
—	—	—	12
0/900	9,1	—	—
1,3	7,1	—	9,5
1,1	13	—	—
2,2	17	—	—
—	21	—	6
—	—	—	5,4
<i>fa</i> × <i>fa</i> ^d	0,19	12	3,2
3,8	5,2	—	12
4,2	1/800 × 10 ^b	—	12
—	8,5	—	15,5
0,7	0/800	—	12
4,3	0/100 × 10,5 ^b	—	9
3,4	6	—	23
4,4	6,2	—	1/500
0,8	13	—	11
0/900	10	—	10
<i>fa</i> × (+) ^e	—	12	8,7
—	17	—	5,2
—	4,4	—	5,2
—	9,6	—	8,2
—	7,3	—	—

^a Premier et deuxième parent du croisement «entre eux».

^b Répétition du croisement.

^c Résultats obtenus par la technique 1. La souche *fa* était I—1 b.

^d Résultats obtenus par la technique 1. Les souches *fa* étaient I—1 b et I—3 a.

^e Résultats obtenus par la technique 2. La souche *fa* était I—1 b.

que ces individus sont caractérisés par une faible réversion, ce caractère n'étant pas ici «agressif».

La perte du caractère agressif a également été observée dans la descendance de *fa* × sauvage illégitime (tableau 9). A nouveau, les valeurs observées dans les croisements avec *nic-2 iso-2* ($0,086 \pm 0,037$) sont inférieures à la moyenne des croisements *F* × *F* ($0,173 \pm 0,083$ ici).

Il est plus difficile d'être certain que le caractère agressif ne se retrouve pas dans la descendance des Croisements entre deux souches *fa* (tableau 9). En effet, 5 fréquences de réversions faibles ont été observées avec *nic-2 iso-2* (sur 20 croisements réalisés). Pourtant, trois de ces croisements ayant été refaits, on a trouvé

respectivement, 0,10, 0,105 et 0,120 comme fréquences de réversions. Il est donc possible que ces valeurs faibles ne soient qu'accidentelles.

De toutes façons, même s'il n'est pas définitivement démontré que n'existe pas de *fa* dans une descendance de $fa \times fa$, il est clair que tous les individus issus de ce croisement ne sont pas *fa* comme on pouvait l'attendre, mais que certains, au moins, ont perdu le caractère « agressif ».

Dans les trois types de descendance que nous venons d'étudier, ($fa \times F$; $fa \times (+)$ et $fa \times fa$), on retrouve donc un nouveau type de souches, que nous avons appelé « faible neutre » (*fn*). Deux souches de ce type, croisées entre elles, donnent une réversion de $0,024 \pm 0,015$, environ 10 fois inférieure à la réversion d'un croisement $F \times F$. Le croisement entre une souche *fn* et une souche *F* donne une réversion qui est en gros la moyenne entre celle de $fn \times fn$ et celle de $F \times F$: On attend $0,151 \pm 0,056$ et on observe $0,100 \pm 0,032$.

Ces résultats sont en faveur de l'autonomie, en ce qui concerne la réversion des génomes *fn* et *F*.

Nous allons maintenant préciser ce point et observer le devenir de *fn* lors de la méiose.

fn: autonomie lors de la réversion et ségrégation à la méiose

Un nouveau type d'expériences a été mis au point pour cette étude. Des souches dites testeuses ont été isolées. Elles sont *F* (forte réversion avec *nic-2 iso-2* compatibles) mais portent le gène *ad-9* à l'état muté. Ce dernier (voir matériel et techniques) est très lié à *nic-2*. Ainsi, dans un croisement $ad^+ nic-2^x \times ad^- nic-2F$ pourra-t-on distinguer la réversion propre à *nic-2^x* qui sera établie en comparant les nombres de colonies sur milieu minimum et sur milieu additionné d'acide nicotinique. Une fréquence de réversion dite globale sera évaluée en comparant les résultats obtenus sur les mêmes milieux, additionnés tous deux d'adénine.

La comparaison de ces deux résultats donnera toute indication sur la caractéristique de *nic-2^x*. En effet, admettons comme le suggèrent les résultats obtenus plus haut, que chaque génome se comporte d'une manière indépendante, *fn* réversant avec une fréquence de 0,02, *F* avec une fréquence de 0,17 (valeurs moyennes obtenues par la technique 2).

Le tableau 10 donne les résultats théoriquement attendus dans les diverses situations possibles. Si l'on compare les nombres de colonies prévues sur les milieux contenant de l'adénine on voit qu'il sera difficile de savoir si la souche *nic-2^x* est de nature *F* (on obtiendrait 17% de réversion) ou de nature *fn* (on obtiendrait 9,5%), la différence attendue étant recouverte par les imprécisions expérimentales. Par contre on attend un résultat clair en comparant les résultats obtenus sur milieux minimum sans adénine, un facteur 8,5 de différence étant prévisible entre un croisement $F \times F$ et un croisement $f \times F$.

Dans le tableau 11 sont consignés les estimations réelles des deux types de fréquences, pour des croisements d'individus issus soit de $fa \times F$ soit de $fn \times F$, avec les souches *ad^{nic}* « testeuses ».

Dans le premier cas, les réversions vues sur milieu Mn sont nettement inférieures à celles observées sur milieu Mn + adénine.

Tableau 10. Résultats théoriques de croisements entre *nic-2^x* et *adnic-2 F*

Type du croisement	Mn ^a	Nic ^b	Réversion Mn/Nic	Ad ^c	Ad Nic ^d	Reversion Ad/Adnic
Faible réversion accidentelle ou						
<i>nic-2 fa</i> × <i>ad-9 nic-2 F</i>	< 1	50	< 0,5%	2	100	< 2%
<i>nic-2 F</i> × <i>ad-9 nic-2 F</i>	8,5	50	17%	17	100	17%
<i>nic-2 f</i> × <i>ad-9 nic-2 F</i>	1	50	2%	8,5 + 1 = 9,5	100	9,5%

^a Milieu minimum.

^b Milieu minimum additionné d'acide nicotinique.

^c Milieu minimum additionné d'adénine.

^d Milieu minimum additionné d'acide nicotinique et d'adénine.

Les résultats sont exprimés en nombre de colonies pour 100 poussant sur milieu *adnic*. La technique n°2 devant être utilisée, les calculs ont été faits en prenant comme valeurs moyennes de réversions, 0,17 pour les fortes, 0,02 pour les faibles.

Tableau 11. Étude de croisements de souches *nic-2^x*, issues d'un croisement *fa* × *F* ou d'un croisement *fn* × *F*, par des souches *ad-9 nic-2 F*

	n° du croisement	Réversion Mn/Nic	Réversion Ad/Nic	Diagnostic
Souches	743	1	12	} <i>fn</i>
<i>nic-2^x</i> issues	747	1,9	15	
de <i>fa</i> × <i>F</i>	748	1,9	9,5	
	751	2,5	13	
	754	2,3	15	
	758	2,4	8,1	
	762	4,7	8,6	
	765	2,7	25	
Souches	777	1,1	5,9	} <i>fn</i>
<i>nic-2^x</i> issues	781	0,8	4,2	
<i>fn</i> × <i>F</i>	783	1,1	16	
	788	2,4	7,8	
	797	0,2	3	
	772	21	14	} <i>F</i>
	779	15	11	
	802	9,2	13	
	804	23	12	
	806	12	9,5	

La technique 2 a été utilisée.

La souche *fa* était I—1 b.

Les résultats sont la moyenne de deux estimations indépendantes.

Les allèles *nic⁻* liés à *ad⁺* reversent donc avec une fréquence faible mais ne présentent pas d'agressivité vis à vis des allèles *F* liés à *ad⁻*. L'hypothèse utilisée pour construire le tableau 10 se trouve donc vérifiée: il y a autonomie des deux

formes de *nic*⁻. D'autre part toutes les souches analysées peuvent être considérées comme *fn*. Ce résultat confirme ce que nous avons vu plus haut (tableau 9). Les souches issues de *fa* × *F* ne sont ni agressives, ni fortes, elles sont « faibles neutres ».

Dans le deuxième cas, à savoir l'étude des descendants d'un croisement de *fn* × *F*, on voit que, cette fois, 5 des souches sont à classer comme *F*: ce caractère se maintient donc à la méliose en présence de *fn*, contrairement à ce qui, apparemment, se passe en présence de *fa*.

Les allèles *nic*⁻ des cinq autres souches ne peuvent être classés comme *F*: les réversions observées sur milieu minimum sont faibles et nettement inférieures à celles précédemment observées.

Les réversions observées sur milieu avec adénine sont parfois inférieures à la valeur moyenne prévue de 9,5; il est donc possible que certains génomes *f* étudiés ici présentent une légère agressivité, mais nous les classerons néanmoins comme *fn* car les croisements *fa* × *F* que nous avons vu jusqu'à présent donnaient des réversions nettement plus faibles que celles observées ici.

Malgré cette réserve, l'ensemble des résultats présentés confirment l'autonomie du type *fn* et du type *F* en ce qui concerne la réversion. D'autre part, la réapparition du type *F* dans les descendants d'un croisement *fn* × *F* est clairement établie, contrairement à ce qui se passe dans un croisement *fa* × *F*. L'autre type parental (à savoir *fn*) existe également dans la descendance envisagée, même si nous n'avons pas pu démontrer définitivement que toutes les souches de ce type soient ici nettement différentes de *fa*.

Etant donné l'importance de ces conclusions, il nous a paru nécessaire de les vérifier plus avant, en étudiant non plus des sporées étalées en masse mais des spores repiquées une à une.

*Analyse spore par spore: symétrie de la réversion dans un croisement $F \times F$
et confirmation de son asymétrie dans un croisement $fn \times F$*

Nous avons analysé un par un les individus issus de divers types de croisements: $F \times ad^- F$ (tableau 12) $fa \times ad^- F$ et $fn \times ad^- F$ (tableau 13).

Les croisements 220 et 592 bis du tableau 12 étaient hétérozygotes pour le gène *col*: on peut noter ici encore (Guerdoux, 1969) qu'il n'existe pas de rapport direct entre le crossing over et la réversion, puisque 8 individus réversés sur un total de 24 ayant subi un remaniement entre *col* et *ad* sont observés. Il est également remarquable que la distance *col ad* (20 U.C.O sur la carte) est du même ordre de grandeur, en tenant compte des erreurs sur des effectifs faibles, chez les individus *nic*⁻ (13 U.C.O.) et les individus *nic*⁺ (18 U.C.O.).

Sur l'ensemble des résultats présentés, les révertants liés à l'allèle *ad-9*⁺ (génotypes + et *col*) ont une fréquence de 0,269. Ceux liés à l'allèle *ad-9* (génotypes *ad* et *col ad*) ont une fréquence de 0,320. Ces deux fréquences étant voisines l'une de l'autre et cette égalité étant observée (aux variations expérimentales près) pour chacun des dix croisements étudiés ici, on peut dire que dans les croisements *nic-2 F* × *nic-2 F*, la réversion est symétrique: chaque « allèle » réverse avec la même fréquence.

Tableau 12. *Symétrie de la réversion dans des croisements ad-9⁺ nic-2 F × ad-9 nic-2 F*

n° du croisement	Génotypes				n° du croisement	Génotypes (pas de CO centre <i>col</i> et <i>ad</i>)			
	<i>nic</i>	+	<i>adnic</i>	<i>ad</i>		<i>nic</i>	+	<i>coladnic</i>	<i>colad</i>
211	22	9	5	3	220	25	6	19	6
212	22	8	6	12	592 bis	38	8	26	17
213	19	10	17	2	Total	63	14	45	23
214	12	9	10	15					
215	20	8	28	15	n° du croisement	Génotypes (CO entre <i>col</i> et <i>ad</i>)			
223	11	13	18	6		<i>colnic</i>	<i>col</i>	<i>adnic</i>	<i>ad</i>
571 bis	37	6	27	5	220	5	4	3	1
588	38	10	26	8	592 bis	4	1	4	2
Total	181	73	137	65	Total	9	5	7	3

CO = crossing over. Cet évènement n'est détectable que pour les croisements comportant les gènes *col* et *ad*, ce qui est le cas pour ceux de la partie droite du tableau (220 et 592 bis). Les souches *ad*⁻ des croisements 571 bis et 592 bis ont servi comme « testeuses » dans la suite des expériences.

Tableau 13. *Symétrie et dissymétrie de la réversion dans des croisements ad-9⁺ nic-2^x × ad-9 nic-2 F*

Type du croisement réalisé ^a	n° du croisement	Individus <i>ad</i> ⁻		Individus <i>ad</i> ⁺	
		<i>nic</i> ⁻	<i>nic</i> ⁺	<i>nic</i> ⁻	<i>nic</i> ⁺
<i>ad-9⁺ nic-2^x=F × ad-9 nic-2 F</i>	772 ^b	34	13	39	17
	804 ^b	14	4	3	2
<i>ad-9⁺ nic-2^x=fn × ad-9 nic-2 F</i>	788 ^b	18	5	48	0
	743 ^c	46	15	66	0
	747 ^c	38	11	46	0
<i>ad-9⁺ nic fa × ad-9 nic-2 F</i> (faible réversion permanente)	701 ^e	30	0	65	0
<i>ad-9⁺ nic F × ad-9 nic-2 F</i> (faible réversion accidentelle)	571 ^d	31	0	32	0

^a D'après les analyses faites en sporées étalées en masse (par exemple voir tableau 11).
^b Souche *ad*⁺ *nic*^x issue de *nic-2 fn × nic F*.
^c Souche *ad*⁺ *nic*^x issue de *nic-2 fa × nic-2 F*.
^d Comparer à 571 bis (mêmes parents). — Voir tableau 12.
^e La souche *fa* est I.1b.

Le tableau n° 13 donne les résultats de l'analyse spore par spore de croisements étudiés dans le tableau n° 11. Les *nic*⁻ des croisements n° 743 et 747 sont issus de *F × fa*. Ceux des croisements n° 772, 788 et 804 sont issus de *F × fn*.

On donne également un exemple de faibles réversions dans le cas d'un croisement $fa \times F$ et dans celui d'une faible réversion accidentelle (n° 571, croisement identique au n° 571 bis présenté dans le tableau n° 11).

On observe une symétrie de la réversion dans les croisements entre souches testeuses et celles des souches issues de $fn \times F$, définies comme F d'après les résultats du tableau n° 11.

Cette confirmation des résultats précédents s'étend à l'autonomie du génome F en présence d'un « allèle » fn . En effet, dans les autres croisements présentés dans le tableau 13, on observe une réversion normale de l'allèle liée à l'*ad* — ce qui signifie donc que le caractère F de celui-ci n'est pas altéré. Par contre, il n'a pas été trouvé de révertants *ad*⁺ : les « allèles » liés à ce dernier marqueur, présumés fn , ne réversent donc pas dans la limite des 160 individus analysés.

*La réversion est donc bien asymétrique dans un croisements
nic-2 $fn \times nic-2 F$ comme on pouvait le déduire des résultats du tableau 11*

Le croisement 701 confirme ce que nous avons déjà vu en sporées étalées en masse : en présence de fa , F ne réverse pas avec une fréquence élevée au contraire de ce que nous venons de voir en présence de fn .

On ne peut savoir alors (pas plus que pour le cas de faible réversion accidentelle présentée ; n° 571) s'il y a ou non symétrie de la réversion puisque l'observation est limitée en nombre.

Les résultats du tableau 13 confirment donc les résultats plus grossiers obtenus sur les sporées étalées en masse. Nous pouvons les résumer en cinq points :

1. Un croisement $F \times F$ donne une réversion élevée, égale pour les deux « allèles ».
2. Un croisement $fa \times F$ donne une réversion faible.
3. Il donne naissance à des souches non agressives fn .
4. Dans un croisement $fn \times F$, la réversion de fn est faible, mais celle de F est normalement élevée ; il y a autonomie des deux « allèles ».
5. Dans la descendance d'un croisement $fn \times F$ existent les deux types parentaux.

Discussion

Dans l'article précédent, nous avons mis en évidence la particularité du mutant *nic-2* de réverser avec une grande fréquence. Les sauvages « illégitimes » obtenus ne présentaient pas de particularité vis à vis de la souche sauvage habituelle. Rien ne semblait indiquer que leur production soit influencée par la recombinaison et l'arrière fond génétique.

Les ségrégations aberrantes observées pouvaient suggérer une hérédité cytoplasmique. Néanmoins, comme nous avons pu localiser la mutation sur le chromosome II, il était clair que la phénomène étudié comportait au moins une composante nucléaire.

Les expériences que nous venons de présenter confirment ces divers points.

D'autre part, elles ont montré que le mutant *nic-2* originel donnait naissance non seulement à des sauvages illégitimes mais aussi à de nouveaux types de souches. Jusqu'à présent nous n'avons pas détecté de variations en cours de

multiplication végétative des diverses souches étudiées ici: elles ont été repiquées plusieurs fois et conservées à 4°, certaines depuis deux ans, sans perdre leurs caractéristiques. Les souches exigeant l'acide nicotinique sont restées mutantes, les souches prototrophes sont demeurées telles. De même, les souches *F*, *fa* et *fn*, n'ont pas perdu leurs aptitudes respectives à la réversion.

Lorsque l'on étudie le comportement des divers types de souches, il apparaît que trois d'entre elles (*nic-2 F*, *nic-2 fn* et sauvage illégitime) sont transmissibles lors de la méiose.

L'étude du croisement $fn \times F$ a dégagé deux points importants ayant trait à l'autonomie des deux «allèles» en présence. Nous avons tout d'abord vu qu'il y avait ségrégation des deux types parentaux: il serait important de savoir si cette ségrégation est mendélienne ou non. Nous ne pouvons répondre à cette question pour le moment étant donné le faible nombre d'individus étudiés. Par contre, le deuxième point nous paraît solidement établi: dans l'hétérozygote fn/F les deux allèles réversent d'une façon autonome, chacun avec sa propre fréquence.

Ce croisement pourrait donc s'interpréter en termes de génétique chromosomique, même en l'absence d'une compréhension de la réversion elle-même.

Par contre, l'existence et le comportement du type transitoire *fa* posent de nouvelles questions, auxquelles il nous semble difficile de répondre en imaginant un mécanisme purement chromosomique. Attachons nous tout d'abord à démontrer la réalité de l'existence de *fa*, type distinct de *fn*.

Les croisements à faibles réversions permanentes auraient pu être interprétées en imaginant que les deux individus croisés étaient *fn*. Dans cette hypothèse, on serait amené à classer comme *fn* toutes les souches impliquées dans un croisement à faible réversion. Il en serait ainsi, par exemple, de la souche I.82 et de la souche *ad-9 nic F* (tableau 13, croisement 701).

Or nous avons vu que la réversion de l'allèle *nic*⁻ de cette dernière souche est forte dans tous les croisements où elle intervient: avec *nic-2 iso-2* (tableau 12, croisement 592 bis) et avec des souches considérées comme *F* ou *fn* (tableau 11, respectivement croisements 802 et 806 d'une part, croisements 758, 762, 765, 781 d'autre part). *ad-9 nic F* est donc bien *F* comme l'indique la nomenclature choisie, et non pas *fn*. Il n'est donc pas possible d'expliquer la faible réversion permanente du croisement $I.82 \times ad-9 nic F$ en admettant que les 2 souche soient *fn*. Comme d'autre part nous avons vu, que quelque soit le partenaire d'une souche *fa* dans un croisement, on obtient une faible réversion et ce pour les 8 souches étudiées (I.82, I.1b, I.8b, I.3b, III-8, IV-15, V-5 et V-8), il nous paraît clair que *fa* est une forme distincte de *fn*.

Cette forme, en plus d'imposer une faible réversion, a deux autres caractéristiques. Tout d'abord, nous n'avons pas pu montrer sa pérennité lors de la méiose. Bien au contraire, quelque soit le partenaire, nous avons constaté la perte du caractère agressif lors de la méiose et la transformation de *fa* en *fn*. De plus, *fa* semble «transformer» *F* en *fn*, puisque nous n'avons pas retrouvé de *F* dans la descendance de croisement $F \times fa$.

Il est bien évident que les deux points que nous venons de signaler sont soumis à des réserves quant à leur généralité: il reste possible que seul le nombre relative-

ment faible de souches étudiées nous ait empêché de retrouver des souches *fa* et *F* parmi les spores issues d'un croisement $fa \times F$. L'étude des descendants d'un croisement $fa \times ad-9\ nic\ F$ permettra de savoir si réellement les deux « allèles » sont toujours modifiés pour donner un troisième et unique type, à savoir *fn*.

Il sera également important de savoir si l'apparition de ces souches *fn* n'est possible qu'en présence de *fa* ou s'il en existe dans une descendance d'un croisement $F \times F$. L'utilisation des souches « testeuses » *ad-9 nic F* doit permettre de répondre à cette question : nous étudions actuellement la réversion de croisements entre individus issus de $F \times F$ et ces souches « testeuses » ce qui, nous l'avons vu (tableau 10) donnera toute indication sur le caractère des souches *nic-2* inconnues.

Les questions que nous venons d'évoquer, se posant à propos de leurs descendants, ne remettent pas en question la qualité première des souches *fa* de conduire à des faibles réversions permanentes.

Il est tentant d'interpréter les faibles réversions accidentelles (faibles réversions se produisant apparemment rarement et au hasard dans un croisement $F \times F$ donnant généralement de fortes réversions) en imaginant qu'un événement $F \rightarrow fa$ a eu lieu pendant les mitoses.

Les parties du dicaryon demeurées F/F donneraient des fructifications à réversion forte, tandis que celles devenues fa/F produiraient des carpophores à faible réversion. Nous aurions ainsi l'explication des faibles réversions accidentelles dans un croisement entre souches déterminées comme *F* par ailleurs.

Si la transformation $F \rightarrow fa$ peut réellement se produire en cours de mitose, comme nous venons de voir que le suggèraient l'interprétation des faibles réversions accidentelles, cela différencierait radicalement cet événement de la réversion. En effet, nous savons que la réversion ne se produit pas en phase végétative, qu'elle soit haploïde ou dicaryotique. D'autre part, la réversion n'est probablement pas un événement préméiotique, car l'on n'a pas relevé de distribution de sauvages de type clonal dans les analyses en tétrades (Guerdoux, 1969).

De toute façon, on doit se demander si l'état transitoire *fa* ne comporte pas un élément cytoplasmique. Des expériences en cours doivent permettre d'obtenir une réponse. Des croisements réciproques vont être réalisés (grâce à la possibilité de spermatisation par des oïdies qui, si elles ne germent pas, peuvent servir d'élément mâle), entre souches *F*, *fn* et *fa*. On essaiera également d'utiliser la possibilité de dédicaryotisation qui existe chez le Coprin, pour rechercher un éventuel élément infectieux. Enfin, l'usage de drogues, tel le bromure d'ethidium, sur les différentes souches en phase végétative devrait également faire évoluer la question de savoir si oui ou non, un élément cytoplasmique intervient dans les nombreuses transformations du mutant étudié.

Celles-ci se font selon des règles qui nous semblent bien établies. Cependant il ne nous paraît pas actuellement souhaitable d'envisager une discussion de fond sur la nature de la mutation étudiée. Nous préférons la reporter à la suite d'un prochain article, lorsque les expériences brièvement évoquées plus haut, auront été menées à leur terme.

Remerciements. Le travail décrit ici a été mené à bien grâce à l'aide très active de Madame Monique Schmaltz que je remercie très vivement. Je remercie également Mademoiselle Michèle Masson dont le concours a été très apprécié.

J. L. Guerdoux: Le mutant *nic-2* chez le *Coprinus radiatus*

Références

- Brinck, R. A.: Paramutation at the R locus in maize. Cold Spr. Harb. Symp. quant. Biol. **23**, 379—391 (1958).
- Guerdoux, J. L.: Réversion à haute fréquence d'un gène nicotinique moins chez le *Coprinus radiatus*. Molec. Gen. Genetics **105**, 334—343 (1969).
- Prevost, G.: Étude Génétique d'un Basidiomycète, *Coprinus radiatus* Fr. Ex. Bolt. Thèse, Paris (1962).

Communicated by G. E. Magni

J. L. Guerdoux
Centre de Génétique Moléculaire
91-GIF sur Yvette/France

ANNEXE 3

Compléments à l'article n° 2

Tous les résultats expérimentaux n'ont pas été donnés in extenso dans cet article. Ceux qui n'ont été que brièvement évoqués figurent ici, ce qui permet de connaître tous les éléments chiffrés des expériences décrites.

Le tableau n°1 donne les résultats de l'analyse de la réversion de 17 sporées d'un même croisement (nic-2 iso-2 (2) x nic-2 iso-2 (3)).

Les écarts observés sur ces fréquences de réversion ont été comparés à ceux observés lors de la répétition d'une même sporée ou de la mesure de sporées de croisements différents (article 2 tableau 2).

Le tableau n°2 regroupe les tests statistiques réalisés : aucune différence significative n'est mise en évidence.

Les tableaux n° 3 et 4 donnent le résultat de croisements entre souches dites fortes : ils n'appellent pas de commentaire.

Les tableaux n° 5 et 6 donnent le résultat de croisements entre fa présumés et nic-2 iso-2 : les valeurs sont toujours inférieures à 1 %, mais la variabilité est grande, même pour un seul croisement (tableau 6).

Conclusion.

Les techniques d'étalement des sporées en masse, sujettes à des variabilités pouvant être dues en particulier à des germinations différentielles donnent des fréquences de réversions présentant parfois des écarts importants. La technique 1 (tableau 1, 3, 4 de cette annexe, tableaux 2 et 6 de l'article 2) donne une valeur moyenne de 0.264 sur 115 résultats dont le plus petit est 0.10 et le plus grand 0.60. La technique 2 donne une valeur moyenne de 0,154 (tableau 3 de cette annexe, tableaux 4 et 11 de l'article 2) pour 84 résultats dont le plus petit est 0,06 et le plus grand 0,41.

Les variations notées semblent être aléatoires et ne pas refléter une qualité spécifique de certains croisements.

Par contre, certains croisements (fa x F) donnent une fréquence de réversion systématiquement inférieure (< à 1 %) quoique variable, aux valeurs précédemment observées.

Tableau 1 : Variabilité de la réversion de sporées issues d'un même croisement (nic-2 iso-2 (2) x nic-2 iso-2 (3)).

Sporée n°	:	1	:	2	:	3	:	4	:	5	:	6	:	7	:	8	:	9	:
reversion	:	21	:	52	:	42	:	32	:	24	:	42	:	42	:	43	:	42	:
Sporée n°	:	10	:	11	:	12	:	13	:	14	:	15	:	16	:	17	:		:
reversion	:	15	:	33	:	14	:	26	:	34	:	25	:	23	:	14	:		:

La technique n°1 a été utilisée.

Tableau 2 : Comparaison statistique des diverses possibilités de variabilité de la reversion.

Comparaison des écarts notés lorsque l'on mesure deux fois une sporée et ceux observés sur les mesures de sporées différentes ^a .						
Test de Fisher $z = 1/2 (L \sigma_1 - L \sigma_2)$						
		N	variance	σ	$L \sigma$	
$S (x - \bar{x}_p)^2$	685,4	10	V_1 68,5	8,28	2,113	
$S (\bar{x}_p - \bar{x})^2$	442	9	V_2 49,1	7	1,946	z limite au seuil de 5% = 0,28
$S (x - \bar{x})^2$	1127,4	19	59,3	7,72	$2z = 0,167$	$z = 0,0835$ non significatif

Comparaison des écarts ci-dessus et des écarts relevés sur l'analyse de plusieurs sporées d'un même croisement b.

$$t = \frac{x_1 - x_2}{\sqrt{\frac{S (x_1 - \bar{x}_1)^2}{N_1} + \frac{S (x_2 - \bar{x}_2)^2}{N_2}}}$$

	$S (x - \bar{x})^2$	$\bar{x}$	N	t pour N - 1 au seuil de 5%	
tableau 3	1127,4	27,65	19	2,10	
tableau 4	1299,6	31	16	2,13	$t = 0,39$ non significatif *

$\bar{x}_p$: moyenne partielle ; $\bar{x}$: moyenne générale
 σ : écart type ; L : logarithme repérien
N : degrés de liberté ; a : voir article 2-tableau n°2

b : tableau 1 de cette annexe

* t étant faible, il est inutile d'envisager la correction

t' de Cochran.

Tableau 3 : Croisements entre souches issues de nic-2 iso-2 (2) x nic-2 iso-2 (3) et les souches nic-2 iso-2 compatibles : réversions observées toutes fortes.

Croisements dont on a analysé une seule sporée											
n° de la souche	: 14	: 15	: 22	: 26	: 28	: 33	: 34	: 36	: 37	: 46	: 47
reversion	: 17	: 11,5	: 38	: 5,5	: 18	: 10	: 13	: E	: 14	: 7,5	: 25
n° de la souche	: 48	: 49	: 50	: 51	: 52	: 53	: 54	: 61	: 62	: 68	: 69
reversion	: E	: 11,5	: E	: 13	: 41,5	: 11	: 17	: 10	: 15	: E	: 12
n° de la souche	: 70	: 73	: 74	: 75	: 76	: 78	: 79	: 80	: 84	: 86	:
reversion	: 27	: 10	: 30	: 9	: E	: 37	: 30	: 21	: 22	: 11	:

Croisements dont on a analysé deux sporées											
n° de la souche	: 3	: 4	: 5	: 6	: 7	: 8	: 21	: 23	: 24	: 25	: 31
reversion 1	: 7,3	: 25	: 13	: E	: 12,5	: 12	: 25	: 8	: 31	: 7	: 12
reversion 2	: E	: 8	: E	: E	: E	: E	: E	: E	: 16	: E	: E
n° de la souche	: 38	: 39	: 40	: 41	: 42	: 43	: 44	: 45	: 55	: 57	: 58
reversion 1	: 16	: 35	: 5,3	: 11	: 10	: 11	: 19	: 15	: 11	: 9	: 28
reversion 2	: 12	: 13	: E	: 15	: E	: 14	: 19	: E	: 7	: 12,5	: 16

La technique n°2 a été utilisée
E = élevée (voir matériel et méthode)

Tableau 4 : Croisements de souches de diverses origines par les souches nic-2 iso-2 compatibles, donnant de fortes réversions.

famille	souche	1a	1d	2a	2c	5c	5d	9b	9d	13b	15d		
I	reversion	29	25	28	29	18	26	17	17	22	20		
II	souche	1	5	6	12	15	16	18	20	26	31	34	
	reversion	60	35	12	32	41	29	32	28	27	15	20	
III	souche	2	5	7	12	13	14	18	22	29	39	40	41
	reversion	30	17	53	18	29	3,3	25	12	12	11	21	47
IV	souche	1	3	6	7	16	19	23	30	34	38	67	
	reversion	36	40	16	35	36	15	15	25	32	31	40	
V	souche	3	4	9	11	13	14	17	27	30	45		
	reversion	21	18	10	11	19	33	47	50	15	35		

La technique n°1 a été utilisée.

Tableau 5 : Croisements de souches de diverses origines par les souches nic-2 iso-2 compatibles, donnant des réversions faibles.

famille I										
souche	:	1b	:	3a	:	3d	:	8b	:	13a
reversion	:	1/1600	:	1/150	:	1/200	:	1/2400	:	0/350
	:	famille III	:	famille IV	:	famille V				
souche	:	8	:	15	:	1	:	5	:	8
reversion	:	1/160	:	1/230	:	1/100	:	1/400	:	1/120

la technique n°1 a été utilisée.

Tableau 6 : Fréquences de réversions faibles : croisement
I. 82 x nic-2 iso-2.

dicaryon	sporée	reversion	dicaryon	sporée	reversion
1	1	0/1600		3	0/2200
	2	0/500		4	29/14000
2	1	1/5000		5	1/13000
	2	0/800		6	3/8000
3	1	0/700	4	7	0/9500
	2	2/950		8	1/2200
	3	0/1000		9	0/800
	4	0/1500		10	0/6600
4	1	0/1800		11	0/20500
	2	0/4600		12	3/3200
				13	0/2400
				14	17/15000

La technique n°2 a été utilisée.

Annexe n° 4

Recherche d'une composante cytoplasmique autonome.

La caractéristique agressive de fa ne se maintenant pas à la méiose, nous avons été amené à envisager un rôle du cytoplasme dans l'agressivité.

Trois types d'expériences ont été réalisés pour tenter de mettre en évidence ce rôle éventuel.

Dédicaryotisation.

La première série d'expériences avait pour but de rechercher un élément contagieux. Cette étude est possible grâce à l'existence de la phase dicaryotique.

Le Coprin possède une phase végétative dicaryotique stable. Un noyau de chaque "parent" existe régulièrement dans tous les articles mycéliens. D'autre part, il est possible de résoudre un thalle dicaryotique en ses constituants haploïdes, par une simple dilacération dans un mixeur (G. PREVOST 1962).

1) Admettons que la fréquence de réversion soit déterminée par la "forme" du gène nic-2 (soit nic-2F soit nic-2f -neutre ou agressive-).

On peut expliquer l'agressivité en imaginant que nic-2 fa possède une particule infectieuse pouvant réduire la réversion de F dans un dicaryon nic-2 fa x nic-2 F. La figure 1A illustre cette hypothèse : après mise en contact de F avec fa dans les articles dicaryotiques, on s'attend à trouver des individus haploïdes dérivés du génome F dont la réversion est modifiée par l'infection particulière que nous avons envisagée.

Un dicaryon fa x F a été réalisé (I.1b A-2 B-2 x nic-2 iso-2 A-1 B-1), cultivé sur milieu naturel, puis dilacéré par mixage. Des colonies haploïdes ont été isolées puis des croisements avec des souches nic-2 iso-2 compatibles ont été réalisés. Le résultat de ces croisements est consigné dans la figure 1B : les colonies dont le génome est issu de I.1b (fa) sont faibles agressives, celles dont le génome est issu de nic-2 iso-2 sont restées F.

2) Nous avons également réalisé ce même type d'expérience à partir de deux dicaryons fa I.82 A-2 B-1 x fn A-1 B-2. Douze colonies

haploïdes A-1 B-2, issues de mixages de ces dicaryons, ont été confrontées à la souche nic-2 iso-2 A-2 B-1. Les dicaryons obtenus donnent tous des sporées dont la fréquence de réversion est d'environ 0.10. 8 colonies haploïdes A-2 B-1 ont été croisées à la souche nic-2 iso-2 A-1 B-2 : les dicaryons obtenus donnent des réversions faibles.

Comme dans l'expérience précédente F et fa, les deux formes fn et fa se retrouvent inchangées après leur mise en commun.

Croisements réciproques.

Une autre possibilité de mettre à l'épreuve une hypothèse cytoplasmique est d'étudier le résultat de croisements réciproques. Chez le Coprin, il est facile de réaliser cette expérience en utilisant les oïdies comme élément pauvre en cytoplasme. Elles ne sont pas capables de germer mais peuvent spermatiser les hyphes mycéliens de groupe sexuel compatible. Elles sont récoltées par lavage d'une culture monocaryotique et filtration à travers un filtre millipore retenant les éléments de plus de 10 μ de diamètre.

L'efficacité de la filtration est vérifiée en étalant un aliquot de la suspension d'oïdies sur un milieu naturel : on constate que rien ne se développe à partir de ce filtrat ce qui exclu une contamination par des fragments d'articles (G. PREVOST 1962).

Grâce à cette technique, des croisements réciproques ont donc été réalisés, entre des souches fa d'une part, F et fn d'autre part. Il n'a pas été possible d'obtenir des spermatisations dans toutes les combinaisons essayées : ainsi, malgré de nombreux essais, le croisement σ I.82 x ϕ nic-2 iso-2 n'a pu être réussi, alors que les spermatisations d'autres souches définies comme F (article 2) par les oïdies l'ont été.

Le tableau 1 récapitule les réussites. Tous ces dicaryons ont produit des sporées, et toutes donnaient peu de révertants. Ceci indique donc que le caractère agressif se transmet par les oïdies.

Ces expériences ont été poussées plus loin : nous avons recherché les caractéristiques de descendants de certains de ces croisements réciproques. Pour cela, des croisements avec les souches testeuses ad-9 nic F ont été réalisés (tableau 3).

Deux des croisements étudiés ne donnaient pas de révertants, même en présence d'adénine. Ils pourraient correspondre à une transmission méiotique éventuelle du caractère agressif, mais également à des "accidents" (article 2). Une expérience plus complète devra être réa-

lisée pour choisir entre ces deux éventualités.

Les descendants des croisements entre fa n° 82 et fn sont fn : ceci est le résultat attendu et confirme la non perennité de fa à la méiose, à condition qu'il n'y ait pas de choix ou de sélection des souches.

L'analyse des croisements entre fa n° 82 et F n'est pas simple . Des individus fn sont retrouvés dans les trois descendance étudiées : la transformation fa $\longrightarrow$ fn se produit donc, quelque soit le "sens" du croisement.

On retrouve également des individus F dans les deux cas, mais on note une hétérogénéité dans les résultats. En effet, le croisement 963 donne naissance à des individus F (10 sur 20 étudiés) alors que le croisement 962 ne donne que des individus fn (12 sur 12 étudiés). Les résultats obtenus sont trop partiels pour envisager une différence de comportement entre les deux croisements étudiés. Nous verrons néanmoins (annexe 5) que le problème se pose.

Action du bromure d'ethidium sur la réversion.

Le bromure d'ethidium (BET) est capable de former des complexes avec les ADN circulaires (BAUER et VINOGRAD 1968). Il est ainsi hautement mutagène pour l'ADN mitochondrial (SLONIMSKI et al 1968).

Nous avons donc étudié son influence sur la réversion, en pensant qu'un élément cytoplasmique pourrait être sensible à la présence de cet agent.

La figure 2 illustre l'expérience réalisée. Le BET à la concentration de 1 μ /ml n'inhibe pas complètement la croissance du coprin sur milieu synthétique : elle est néanmoins fortement ralentie. A 40 μ /ml dans le milieu naturel utilisé pour obtenir des fructifications, le BET ralentit également la croissance et la production des carpophores.

Les sporées obtenues ont été analysées et leur fréquence de réversion consignée dans le tableau 3 : elles sont semblables à celles observées en absence de bromure d'ethidium.

Conclusion.

Les expériences que nous venons de décrire n'ont pas permis de

mettre en évidence une composante non nucléaire dans le problème étudié.

En particulier, la forme fa ne se comporte pas comme étant infectieuse.

Nous avons également constaté que sa caractéristique agressive ne se perd pas en multiplication végétative, même en présence, dans un dicarvon, de F ou fn.

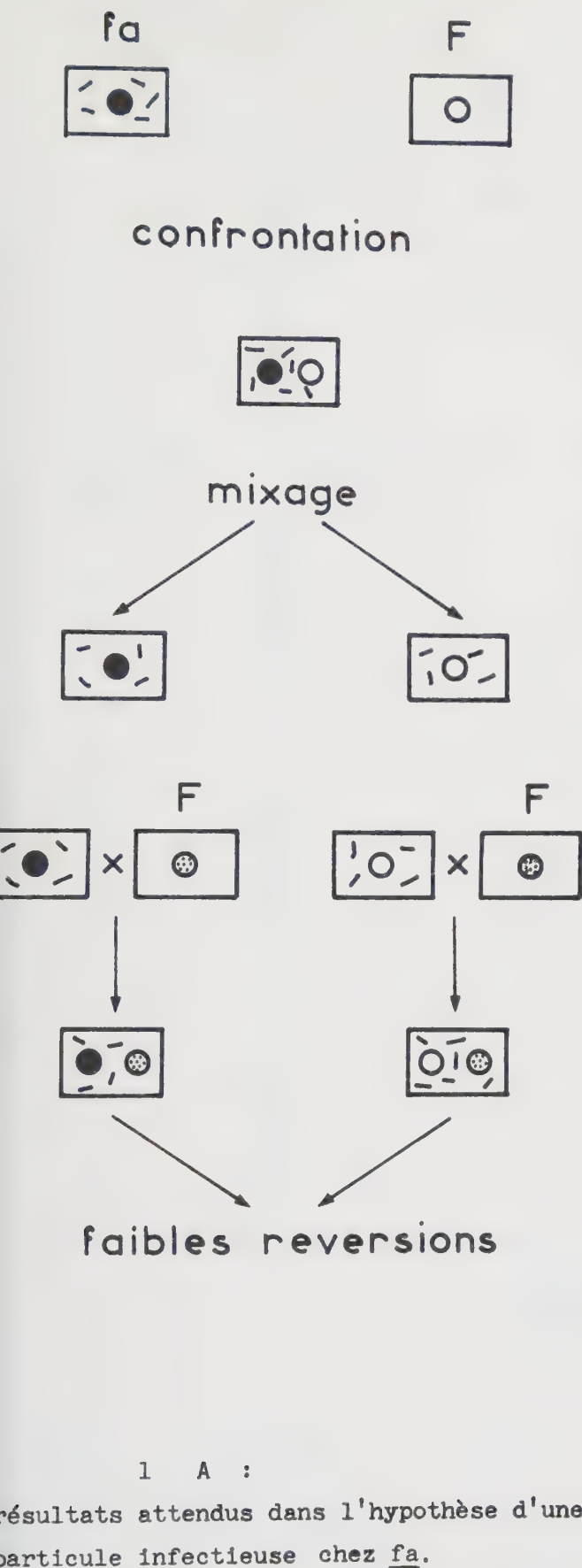
De plus, les divers croisements étudiés se comportent de la même façon lorsque la transmission des génomes se fait par les oïdies pauvres en cytoplasme, ou par des articles mycéliens qui, eux, en sont riches, alors que des croisements similaires démontrent, chez *Neurospora* (Mitchell et Mitchell 1952) la nature cytoplasmique du mutant pocky, mutation gouvernant les protéines structurales des mitochondries (WOUDWARD et MUNKRES 1966).

Enfin, les expériences préliminaires réalisées avec le bromure d'ethidium, comme pour interférer avec les ADN cytoplasmiques n'indiquant pas de modification de la réversion.

Nous n'avons donc, à la suite de ces expériences, aucune indication d'existence d'une composante cytoplasmique autonome dans le phénomène que nous étudions.

REFERENCES.

- BAUER, W. et VINOGRAD, J. (1968) : The interaction of closed circular DNA with intercalative dyes. I. The superhelix density of SV 40 DNA in the absence and presence of dye. *J. Molec. Biol.* 33, 141-171,
- MITCHELL M.B. et MITCHELL, H.K. (1952) : A case of "maternal" inheritance in *Neurospora crassa* . *Proc. Nat. Acad. Sci.* 38, 442-449.
- PREVOST, G. (1962) : Etude génétique d'un basidiomycète : *Coprinus radiatus* Fr. ex. Bolt. Thèse Paris.
- SLONIMSKI, P.P.; PERRODIN, G. et CROFT, J.H. (1968) : Ethidium bromide induced mutation of yeast mitochondria : complete transformation of cells into respiratory deficient non chromosomal "petites". *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 30, 232-238.
- WOODWARD, D.O. et MUNKRES, M.D. (1966) : Alterations of a maternally inherited mitochondrial structural protein in respiratory deficient strains of *Neurospora*. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 55, 872-880.



I.1b $A_2B_2 \times \text{nic}_2\text{iso}_2A_1B_1$

dicaryon

mixage

14 colonies
 A_2B_2

18 colonies
 A_1B_1

$\times$
 $\text{nic}_2\text{iso}_2A_1B_1$

$\times$
 $\text{nic}_2\text{iso}_2A_2B_2$

dicaryons

dicaryons

faibles
reversions
0/72 à 0/480

fortes
reversions
 $0,35 \pm 0,12$

1 B :

expérience réalisée et résultats.

Figure 1 : Expérience de dédicaryotisation

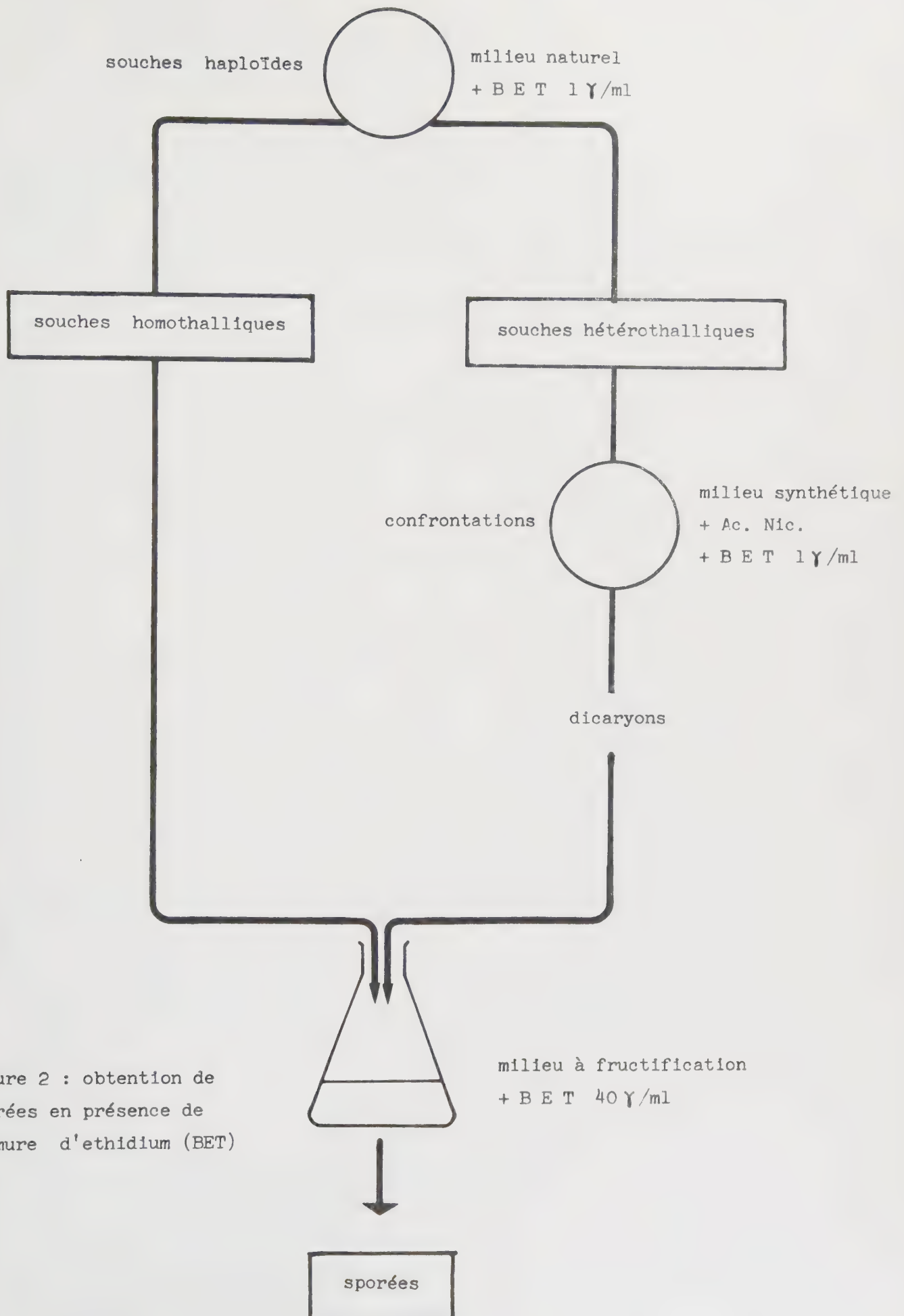


Figure 2 : obtention de
sporées en présence de
Bromure d'ethidium (BET)

TABLEAU 1 : Croisements réciproques entre fa, fn et F : souches utilisées.

	♂ fn		♂ F		♀ fn		♀ F	
	souche	n° du croisement	souche	n° du croisement	souche	n° du croisement	souche	n° du croisement
fa I-82	258 ^a /12	858	nic-2 iso-2(3)	867	258/18	928	I-21	962
	258 /10	860	nic-2 iso-2(3)	875			-84	963
		942	TT (3)	868			-86	964
				874			-69	965
				927				

258 : I.1b (4) x nic-2 iso-2 (1) - fa x F , 258-10,12,18 : spores issues de ce croisement.

TT : souche testeuse ad-9 nic F.

I : famille I, spores issues de nic-2 iso-2 (2) x nic-2 iso-2 -article 2-.

Tableau 2 : Nature des descendants des croisements réciproques.

Parents	n° du croisement	fn	F	fa ou "accident"
♀ fa x ♂ fn	858	10	0	
♂ fa x ♀ fn	928	12	0	
♀ fa x ♂ F	867	5	1	1
♂ fa x ♀ F	962	12	0	
	963	10	10	1

Tableau n° 3 : Fréquences de reversion de sporées obtenues
en présence de bromure d'ethidium.

souches		réversion
homothalliques	h. fn	0/230
	h. F n°1	0.09
	h. F n°2	0.18
hétérothalliques	fa x fn	0/1200
	fa x F	0 /450
	F x fn	0,17
	F x F	0,38

Les souches homothalliques (h) sont décrites dans l'article 3.

Annexe 5

Influence de fa sur F.

Nous avons mis en évidence l'existence de souches fa en montrant que tout croisement dont l'un des parents, au moins, est de ce type donne une faible réversion (article 2).

D'autre part, nous avons recueilli des informations contradictoires (article 2 et annexe 4) sur le devenir de F en présence de fa.

Nous allons décrire ici des expériences permettant de préciser ces observations.

Variabilité de la réversion dans les croisements fa x F et fa x fa.

Le tableau 1 regroupe les fréquences de réversions observées (article 2) dans ces croisements entre souches fa et F : quoique toujours inférieures à la fréquence de réversion élevée (0,23) elles apparaissent comme peu constantes.

Pour le moment, nos expériences ont été limitées par la rareté des souches fa ce qui, lié à l'existence des quatre groupes d'incompatibilités n'a pas permis d'étudier toutes les combinaisons souhaitées.

Nous avons analysé de nombreuses sporées de deux croisements fa x F. La figure 1 résume cette expérience.

Les fréquences de réversions observées sont portées en abscisse après que nous les ayons classées des plus faibles aux plus fortes. Elles sont représentées par les 2 valeurs extrêmes qu'elles peuvent prendre, calculées d'après le nombre de révertants et le nombre de spores viables ensemencées, au seuil de 5 %. Le nombre des révertants étant parfois faible, sinon nul, les écarts peuvent être importants. Ils sont variables, car ils dépendent également du nombre de spores sur lequel est faite l'estimation.

Les sporées analysées ici proviennent de croisements entre les deux souches fa I.1b et I.82 par les souches nic-2 iso-2 compatibles. Le graphique montre que la réversion de croisements fa x F peut prendre des valeurs pouvant aller de 10^{-1} à 10^{-4} et peut être moins. En tous cas, elles sont toujours inférieures à la valeur des réversions fortes (0,23). Si l'on classe les valeurs obtenues en 3 groupes, on obtient les résultats

consignés dans le tableau 2 : ce classement indique une dissemblance entre les deux séries de sporées (la probabilité pour que les résultats soient distribués au hasard est de 0,015). Le croisement I.1b x nic-2 iso-2 est capable de donner plus souvent que le croisement I.82 x nic-2 iso-2 des réversions relativement élevées (plusieurs fréquences observées supérieures à 0,01).

La variabilité de la réversion des sporées issues de fa x F nous a conduit à nous demander s'il en serait de même pour un croisement fa x fa. La figure n°2 illustre l'expérience réalisée.

On obtient des réversions pouvant atteindre une fréquence de l'ordre de 10^{-3} . Cette série de sporées donne des valeurs présentant une variabilité analogue à celle observée précédemment, dans les croisements fa x F.

Un croisement fa x fa donne donc des révertants avec une fréquence non négligeable, qui est à rapprocher des fréquences observées dans ces croisements fa x F. Il ne semble donc pas y avoir de synergie entre les deux allèles fa.

Dissymétrie de la réversion du croisement I.82 x $\underline{ad}^-$ nic F

La réversion d'un croisement fn x F est asymétrique (article 2) ce qui indique que chaque allèle réverse pour son propre compte. Nous nous sommes demandés s'il en était de même dans un croisement fa x F. Des sporées I.82 x $\underline{ad}^-$ nic F ont été étalées sur milieu Mn et Ad, les résultats sont consignés dans le tableau 3.

Cette expérience préliminaire montre que les 66 individus nic⁺ obtenus sont tous $\underline{ad}^-$, et correspondraient donc tous à la réversion de l'allèle F.

Ici donc, la réversion des deux formes est aussi asymétrique : le dicaryon fa x F étudié se comporte comme un dicaryon fn x F, mais sa réversion globale est bien inférieure à celle de ce dernier.

Caractéristiques des descendants de fa x F

L'analyse des descendants de croisements fa x F, jusqu'à présent a donné des résultats quelque peu contradictoires, consignés dans le tableau n°3. Si dans tous les cas, on observe dans la descendance

un nouveau type de souches (fn), certains croisements ségrègent en plus des souches de type F. Le faible nombre d'individus étudiés ne permet pas d'affirmer qu'existe vraiment une différence, certains croisements ne ségrégeant vraiment aucun F. Seule dans ces conditions, l'étude de nombreux descendants permettrait d'être certain que des problèmes de choix ou de sélection n'interviennent pas.

En fait, il est beaucoup plus simple pour l'étude de l'éventuelle transformation de F en fn sous l'influence de fa, d'utiliser des souches marquées. Nous avons donc croisé une souche fa (I.82) par une souche ad⁻ nic⁻ F (TT (3)). Deux cents spores issues de ce dicaryon ont été ensemencées une à une sur milieu germination. Soixante dix huit nic⁻ ont germé : dix d'entre elles étaient ad⁻ et 68 étaient ad⁺. Cinq souches ad⁺ ont été croisées aux souches testeuses ad-9 nic-2 F : elles se sont révélées être fn.

Trois souches ad⁻ ont été étudiées. Les croisements de deux d'entre elles (n°4 et 62) avec des souches fn de la même génération ont donné des sporées produisant peu de révertants sur milieu minimum et de l'ordre de 0.10 sur milieu additionné d'adénine : les génomes 4 et 62 sont donc F.

La troisième (n°67) a été croisée à nic-2 iso-2. Parmi 20 descendants ad⁻ de ce croisement, 6 se sont révélés nic⁺ : le génome 67 est donc également F.

La ségrégation de ce type de souche dans un croisement fa x F n'est pas lié aux techniques utilisées dans les expériences de spermatisation, ce qui pouvait être prévisible mais demandait néanmoins vérification.

Conclusion.

Les expériences décrites ici doivent être amplifiées avant que des conclusions définitives puissent être énoncées. Néanmoins l'action "trans" de fa sur F, en ce qui concerne la réversion est nette. Il est également manifeste que la fréquence de réversion d'un dicaryon fa x F est très variable, mais qu'elle est toujours nettement inférieure à celle d'un croisement F x F.

Il est possible que des degrés différents d'agressivité existent. Ceci pourra être confirmée en vérifiant que I.1b, quelque soit son

partenaire F, donne des fréquences de réversions significativement plus élevées que celles de croisements faisant intervenir I.82.

Une première indication (tableau 2) a été obtenue, montrant une dissymétrie de la fréquence de réversion des deux allèles. Les résultats obtenus semblent indiquer que la réversion de la forme fa est négligeable (0 sur 175.000 spores). Pourtant nous avons vu qu'un croisement fa x fa sonnait une fréquence de révertants assez importante. Ces deux types d'expériences conduisent à des conclusions apparemment contradictoires : cette contradiction peut n'être due qu'à l'utilisation de I.82 d'une part, de I.1b et de I.13a d'autre part.

L'obtention de nouvelles souches fa et leur connaissance approfondie, grâce aux croisements avec des souches ad⁻F, devrait permettre de mieux comprendre les problèmes de l'agressivité.

Nous avons pu en utilisant des souches marquées, confirmer la transformation de fa en fn et montrer la possibilité de retrouver des individus F dans la descendance d'un dicaryon fa x F.

Pour être certain que la forme fa est toujours transformée en fn à la méïose, il faudra étudier de nombreux descendants. De même, la possibilité d'une transformation F $\longrightarrow$ fn sous l'influence de fa existe. Elle peut avoir des causes triviales telle qu'un choix inconscient de certaines souches par l'expérimentateur, ou l'obtention plus ou moins facile de certaines fructifications. Si elle existe réellement, cette transformation pourra être mise en évidence en étudiant plusieurs descendance de croisements entre souches fa et souches ad-9 nic-2 F.

Tableau 1 : Réversions observées dans des croisements fa x F.
(article 2)

croisement	I.1b par I.1a	I.1b x I.9b	I.3a x I.9d	I.8b x I.1a	I.8b x I.9b	III.8 x III.40	IV.15 x IV.1
réversions	1/530	1/200	5/3000	0/1400	0/1500	1/100	1/120
croisement	V.5 x V.15	V.8 x V.30	I.82 x ad ⁻ F	I.82 x différentes souches F			
réversions	0/330	1/160	8/1400	0/360 à 0/1000			

Tableau 2 : Regroupement en classes des résultats de la figure 1.

fréquence de réversion		$10^{-1} < f < 10^{-2}$	$10^{-2} < f < 10^{-3}$	$10^{-3} < f < 10^{-4}$
observées	I.1b	9	6	9
	I.82	0	11	11
	total	9	17	20
théoriques	I.16	4.7	8.9	10.5
	I.82	4.3	8.1	9.5

Tableau 3 : révertants de I.82 x ad-9 nic-2 F.

sporées	nombre de révertants		valeurs approximatives	
	Mn	Ad	nombre de spores viables étalées $\times 10^{-3}$	fréquence de réversion $\times 10^{-3}$
1	0	8	64	0.12
2	0	3	16	0.2
3	0	15	13	1
4	0	1	16	0.6
5	0	33	4,2	7
6	0	6	62,5	0.1

Le nombre de spores viables étalées est très approximatif : il a été évalué en observant le nombre de spores germées dans un champ oculaire, et en estimant que la surface d'une boîte de Pétri était égale à 640 fois la surface observée à la loupe binoculaire.

Tableau 4 : Caractéristiques des descendants de dicaryons
fa x F (article 2 et annexe 3).

parents	descendants	
	fn	F
I.1b x I.1a ¹	10	0
I.1b x nic-2 iso-2 ²	8	0
♀ I.82 x ♂ nic-2 iso-2 ³	5	1
♂ I.82 x ♀ I.21 ³	12	0
♂ I.82 x ♀ I.84 ³	10	10

1. article 2 tableau n°9 : on a caractérisé les souches en les croisant entre elles et avec les souches nic-2 iso-2 compatibles.
 2. article 2 tableau 11
 3. annexe 3
- } dans ces deux cas, on a caractérisé les souches en les croisant aux souches ad-9 nic-2 F testeuses.

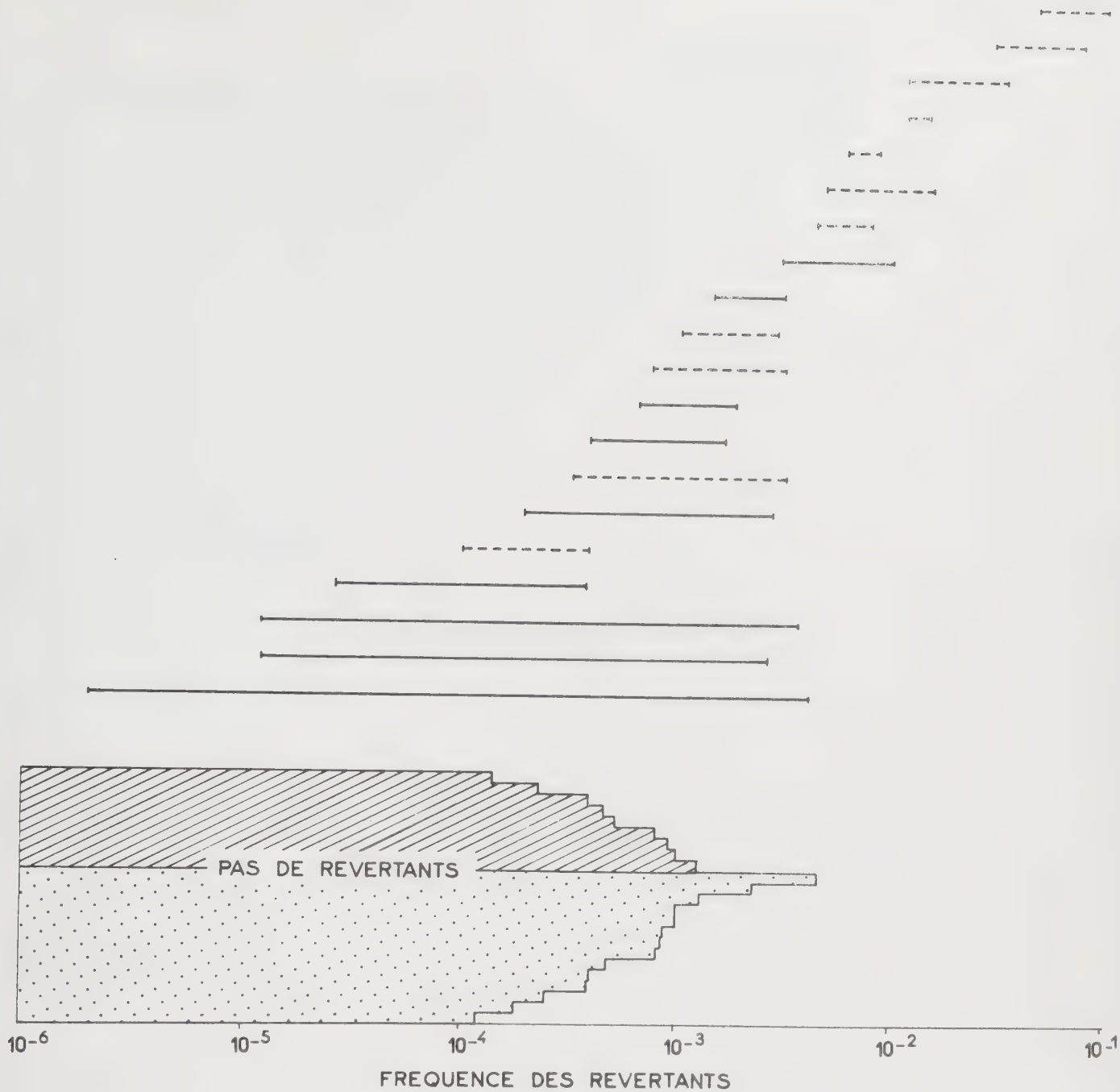


figure 1 : Révertants de 2 croisements $f_n \times F$.

.....	et	////	I.1b x <u>nic-2</u> <u>iso-2</u>
———	et		I.82 x <u>nic-2</u> <u>iso-2</u>

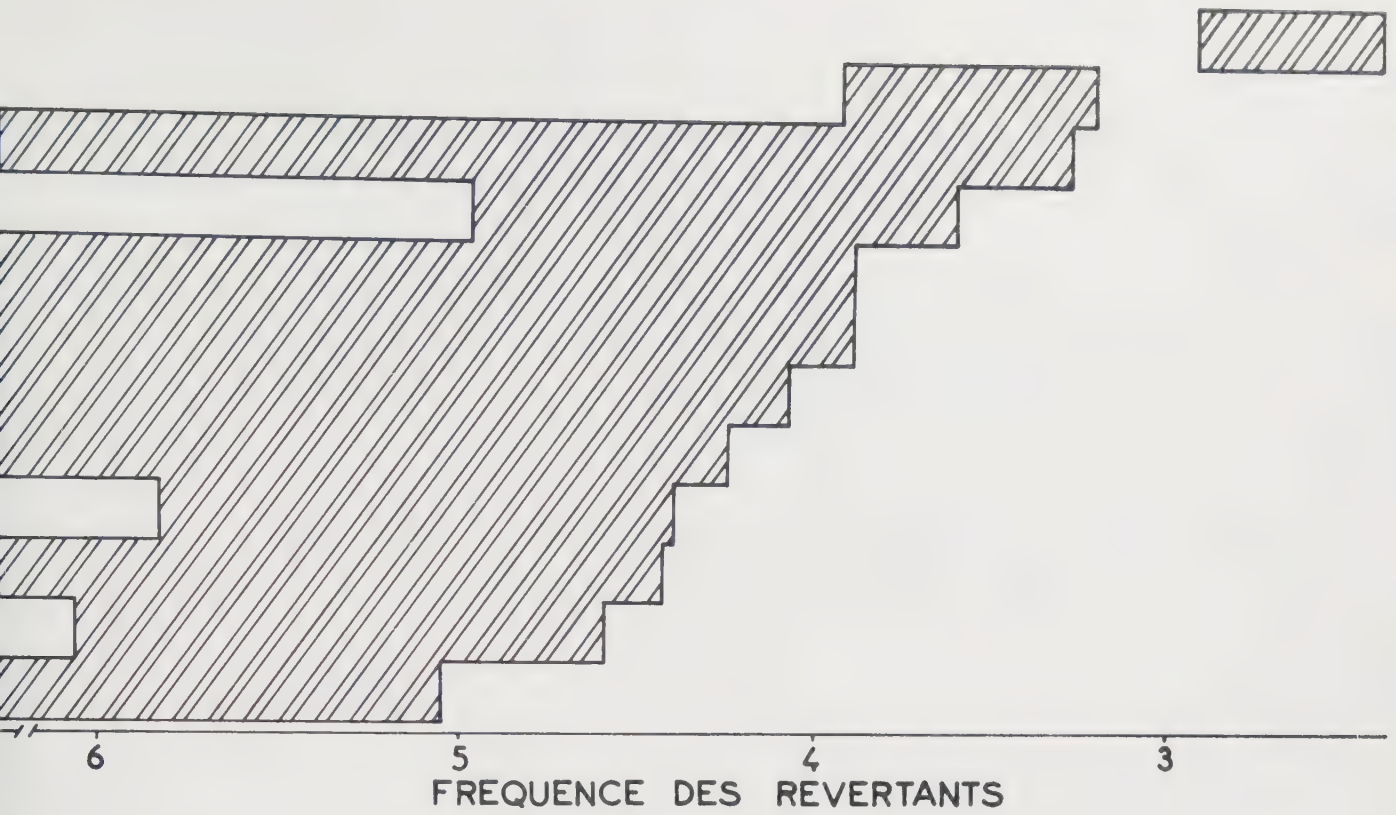


figure 2 : Révertants d'un croisement fa x fa (I.1b x I.13a)

ARTICLE 3

REVERSION A HAUTE FREQUENCE DU MUTANT NICOTINIQUE DEUX DU
Coprinus radiatus : Etude de souches nic-2 homothalliques
ou diploïdes.

J.L. GUERDOUX - Centre de Génétique Moléculaire - GJF sur Yvette (91)
Faculté des Sciences d'Orsay - ORSAY (91) FRANCE

HIGH FREQUENCY OF REVERSION OF A NICOTINIC MUTANT IN *Coprinus radiatus* : Study of nic-2 homothallic or diploïd strains.

SUMMARY

The study of the high reversion frequency of the nic-2 mutant of *Coprinus radiatus* has been carried out with the help of homothallic strains and by selecting for diploïds. Homothallic strains revert at meiosis with the usual frequency of about 20 % ; this is definitely in favor of the high reversion frequency being an intrinsic property of the mutation. Diploïd nic-2 strains also exhibit the usual reversion frequency at meiosis but no more than haploïd strains or dicaryotes do, they do not revert during vegetative growth. The reversion is therefore not directly correlated with the diploïd state.

INTRODUCTION

Le mutant nicotinique deux (nic-2) du *Coprinus radiatus* réverse à la méiose avec une fréquence de 20 à 30 % alors que le caractère d'auxotrophie se maintient parfaitement en phase végétative (GUERDOUX 1969). Devant l'ordre de grandeur étonnant du retour à l'état sauvage, il est tentant d'envisager des situations polygéniques complexes permettant d'expliquer le phénomène : toutes les souches haploïdes dérivent de la souche mutante

originelle et elles ne peuvent être considérées comme génétiquement semblables, malgré les deux isogénisations réalisées. C'est pourquoi nous avons entrepris l'étude de la réversion dans des fructifications de souches nic-2 haploïdes homothalliques.

D'autre part, nous avons voulu préciser le moment où se produit la réversion. Nous savons déjà qu'elle ne se produit pas en cours de multiplication végétative haploïde ou dicaryotique car la distribution des révertants dans les tétrades n'est pas clonale (GUERDOUX, 1969). Elle peut se produire soit au moment de la phase diploïde fugace des jeunes basides (PREVOST, 1962) soit durant ou après la méiose.

L'étude de la réversion en phase végétative diploïde a permis, nous allons le voir, de choisir entre ces deux éventualités.

MATERIEL ET METHODES.

La plupart des souches, des milieux et des techniques utilisés ont été décrits en détail dans les articles précédents (GUERDOUX 1969, 1971). Rappelons que les symboles des différents milieux de culture sont Mn pour le milieu synthétique minimum, Nic pour le milieu Mn additionné d'acide nicotinique, Ad pour le milieu supplémenté en adénine et histidine (besoins nutritionnels du mutant ad-9) et Ad Nic pour le milieu synthétique additionné des trois métabolites que nous venons d'envisager.

Rappelons également que la réversion est étudiée soit sur des souches issues de tétrades ou de spores repiquées une à une, soit par étalement en masse des spores sur les différents milieux. La technique utilisée ici (technique n°2 - GUERDOUX 1971) donne des fréquences moyennes de réversion de $0,17 \pm 0,08$ pour un croisement nic-2 F x nic-2 F et de l'ordre de 0,02 pour un croisement nic-2 fn x nic-2 fn, nic-2 F et nic-2 fn étant deux formes du mutant caractérisées par les fréquences de réversions que nous venons d'indiquer. (GUERDOUX 1971)

Pour préciser la réversion propre à chaque "allèle", des souches "testeuses" à forte réversion sont utilisées. Elles portent un gène ad-9 à l'état muté (ad-9 est à 4 U.C.O. de nic-2 et le

marque donc assez étroitement (GUERDOUX 1969-). Dans un croisement $\underline{ad}^+ \underline{nic} F \times \underline{ad}^- \underline{nic} F$, la fréquence de réversion est la même parmi les individus $\underline{ad}^+$ et $\underline{ad}^-$: elle est d'environ 0,17. Par contre, un croisement $\underline{ad}^+ \underline{nic} \underline{fn} \times \underline{ad}^- \underline{nic} F$ donne une réversion asymétrique, sa fréquence étant élevée parmi les $\underline{ad}^-$ et bien plus faible parmi les $\underline{ad}^+$. L'utilisation de ces souches permet donc de savoir si une souche de nature inconnue est F ou $\underline{fn}$.

Enfin le retour de l'état dicaryotique à l'état monocaryotique se fait par dilacération du mycélium dans un mixeur (N. PRUD'HOMME, 1966).

Etude de souches $\underline{nic-2}$ homothalliques.

1) Etude de la réversion forte.

La grande majorité des souches du coprin sont hétérothalliques, l'incompatibilité étant sous la dépendance de 2 loci, A et B, qui doivent être tous deux sous forme allélique différente pour qu'une confrontation des mycéliums produise un dicaryon (PREVOST, 1962). Cependant comme d'autres basidiomycètes hyménomycètes, le coprin peut exister naturellement sous forme homothallique, le mycélium issu d'une spore monocaryotique haploïde différenciant des carpophores et des basides porteuses de tétrades.

L'étude cytologique (BRYGOO comm. pers.) de ce type de souches montre que la méiose est normale. Nous pouvons donc étudier la réversion méiotique de $\underline{nic-2}$ dans des conditions de stricte homozygotie.

L'analyse du caractère d'homothallisme d'une première souche, étudié après isogénisation avec la souche sauvage de référence, a montré qu'un seul gène le déterminait (MOTTA, comm. pers.). Néanmoins, les fructifications arrivent difficilement à maturité et c'est une souche homothallique récoltée dans la nature (BRYGOO comm. pers.) qui a été croisée à une souche $\underline{nic-2}$ $\underline{iso-2}$ compatible.

Sur 17 tétrades analysées, 14 présentent une ségrégation mendélienne ($2\underline{nic}^+ 2\underline{nic}^-$) et 3 une ségrégation aberrante ($3\underline{nic}^+ 1\underline{nic}^-$) : le croisement d'une souche $\underline{nic-2}$ à une souche sauvage d'origine géographique différente, donc non isogénique, donne des sauvages "illégitimes", comme nous l'avons observé dans les croisements avec

la souche sauvage de référence (GUERDOUX 1969, 1971).

Trente souches nic issues de ce croisement ont été mises à fructifier : dans 11 cas, des carpophores ont été observés, les souches correspondantes possédant donc le gène d'homothallisme (noté h). Quatre descendance ont été analysées et les résultats consignés dans le tableau n°1 : dans des conditions de stricte homozygotie, la réversion se produit avec une fréquence de même ordre de grandeur que dans les croisements étudiés précédemment.

2) Recherche de souches à faible réversion.

Nic-2 existe sous plusieurs formes, ayant des fréquences de réversions plus ou moins élevées (GUERDOUX, 1971). La forme originelle réverse avec une fréquence d'environ 20% : elle est dite forte (F). Dans la descendance d'un croisement nic-2 F x nic-2 F, la majorité des souches obtenues conservent ce caractère. Cependant quelques unes, dites faibles agressives (fa), se comporte différemment : tout croisement comportant un "allèle" fa donne une réversion inférieure à 1 %. Cette forme fa n'est pas pérenne lors de la méiose, stade pendant lequel le caractère agressif se perd. La nouvelle forme, dite faible neutre (fn), réverse avec une fréquence de l'ordre de 2 % mais n'a pas d'effet "trans" sur un allèle F. En effet, il a été possible de montrer, grâce à l'utilisation des souches testeuses (voir matériel et méthodes), qu'un croisement fn x F donne une réversion dissymétrique, faible pour l'allèle fn et de l'ordre de 20 % pour l'allèle F.

Nous avons utilisé les souches nic-2 h pour tenter de préciser les modalités de ces transformations. Pour cela, nous avons recherché dans la descendance de nic-2 h n°49 des cas de faibles réversions. Un tri rapide a tout d'abord été réalisé en étalant de 40 à 200 spores sur milieu minimum (une précision plus grande sur le nombre de spores ensemencées est difficile à donner -voir matériel et méthodes - GUERDOUX 1971).

Nous avons obtenu, à partir des souches nic-2 h, 80 sporées germant convenablement. 77 donnaient un nombre de révertants compatibles avec une nature nic F des souches étudiées. Par contre, les sporées issues des souches nic-2 h n°71, 74 et 96 ne donnaient aucun révertant bien que le nombre de spores germées sur les boîtes de Pétri soit substantiel.

Ces souches ont été croisées aux souches nic-2 F ou ad-9 nic-2 F testeuses (tableau n°2). Les croisements avec nic-2 F ont donné des fréquences de réversion non compatibles avec une nature fa des génomes 71, 74 ou 96. Les croisements des souches 71 et 96 avec une souche testeuse ont donné des sporées analysables, leur étude indique que les génomes 71 et 96 sont faibles neutres (réversion "normale" de l'allèle F lié à ad⁻, réversion faible des allèles 71 et 96 liés à ad⁺). Cette conclusion a été confirmée par l'analyse une à une des souches issues du croisement de la souche 71 par la souche testeuse. Sur 108 souches analysées, 68 ad⁺ étaient toutes nic⁻ (réversion de 0 à 5 %) donc l'allèle est à classer comme faible. Par contre, sur les 40 souches ad⁻, 9 étaient nic⁺. La réversion de l'allèle lié à ad⁻ est donc élevée (11 à 28 %) et il n'y a pas "agressivité" du génome faible : la souche nic-2 h n°71 est fn.

Ceci montre donc que la transformation de nic-2 F en nic-2 fn peut se produire dans des conditions de stricte homozygotie.

Etude de souches nic-2 diploïdes.

1) Fabrication des souches.

N. PRUD'HOMME (PRUD'HOMME 1970) a mis au point une méthode d'isolement des souches diploïdes chez le coprin. Une souche portant une mutation morphologique on (ondulé) croisée à une souche compatible portant une autre mutation morphologique, indépendante, côl (coloniale) donne un dicaryon phénotypiquement sauvage et stable, dans les conditions habituelles de culture. Pourtant, dans un milieu liquide non aéré, en présence de tampon acétate 1 M, pH 5,9, le dicaryon se résout en ses deux constituants haploïdes, reconnaissables à leur croissance réduite due aux mutations morphologiques. Des secteurs sauvages apparaissent parfois et il a été démontré qu'il s'agissait de diploïdes.

Un mixage des portions de thalles présentant l'aspect sauvage permet d'isoler facilement des souches diploïdes sans contamination de noyaux haploïdes parentaux.

Nous avons réalisé une telle expérience à partir d'un dica-

ryon col nic A-2 B-1 x on nic A-1 B-2. Plusieurs secteurs présumés diploïdes ont été mixés et des souches à aspect diploïde ont été isolées.

La dilacération par mixage de ces souches n'a donné naissance qu'à de rares individus nains (tableau 3) ce qui affirme leur nature diploïde, un dicaryon col/on donnant par ailleurs de nombreux individus haploïdes à croissance réduite (PRUD'HOMME 1970).

2) Réversion méiotique.

La réversion de ces diploïdes a été étudiée : les fructifications ont été assez difficiles à obtenir, néanmoins on a pu voir, en sporée, que la réversion de deux souches diploïdes était élevée (B-1 → 0,24, B-3 → 0,13) et de valeur sensiblement égale à celles observées couramment (le dicaryon ayant donné naissance au diploïde donnait en particulier une réversion de 0,23). Notons que le simple étalement des spores en masse ne permet de connaître la réversion que des individus de génotype col⁺ on⁺. Les trois autres quarts des thalles, issus du diploïde col nic +, ont une croissance plus ou moins réduite, à cause des mutations morphologiques :
+ nic on
il n'est pas possible de savoir, au vu de leur croissance sur les différents milieux s'ils sont auxotrophes ou prototrophes.

Nous avons également étudié la réversion de diploïdes en analyse de tétrades. Pour connaître l'exigence ou la non exigence en acide nicotique des souches morphologiques, des dicaryons avec les souches nic-2 iso-2 compatibles ont été réalisés et leur croissance sur milieu minimum étudiée : la non croissance sur milieu minimum implique que la souche à aspect morphologique porte l'allèle nic⁻, alors que la croissance implique la présence dans son génome d'un gène nic⁺. Le tableau n°4 résume cette expérience.

Les résultats concernent des tétrades prélevées sur des fructifications de deux diploïdes, B-1 et B-3, issus d'un même dicaryon. Comme il n'y a pas, à première vue, de grande différence entre les deux séries, nous avons fait la somme des résultats. A part un excès de tétrades à 0 spore germée (pouvant correspondre à des tétrades prélevées avant maturité des spores), on ne note pas de différence significative avec les effectifs théoriques prévus.

Malgré la petite taille des effectifs étudiés, nous croyons pouvoir dire que, comme nous l'avions vu dans la descendance de dicaryons, la répartition des sauvages "illégitimes" dans les tétrades suit les lois du hasard : elle n'est certainement pas clonale, ce que l'on pourrait observer si la réversion était pré-méiotique.

La réversion élevée observée indique que les diploïdes étudiés avaient bien conservés les allèles nic-2 F du dicaryon d'origine. Ceci étant nous nous sommes intéressés à ces diploïdes en phase végétative.

3) Absence de réversion en phase végétative.

Les diploïdes isolés donnant de fortes réversions à la méiose, nous avons étudié leur comportement en cours de multiplication mitotique.

Un mixage du diploïde B-3 a été réalisé et nous n'avons pas obtenu de colonies croissant en présence de milieu minimum, alors que le témoin en présence d'acide nicotinique indiquait que nous avions 880 colonies viables. La réversion ne se produit donc pas -en tous cas dans la limite des 880 individus- dans une souche diploïde en phase végétative.

CONCLUSION

L'utilisation des souches homothalliques et diploïdes, formes inhabituelles du coprin, ont permis de préciser quelques points importants du comportement du gène nic-2.

Tout d'abord, nous avons vu que la réversion se produisait

dans des conditions de stricte homozygotie.

La réversion est donc une qualité intrinsèque du mutant étudié et n'est définitivement pas due à la ségrégation d'un système polygénique.

Nous n'avons pas pu mettre en évidence de transformation $F \rightarrow fa$ dans ces souches, comme nous l'avions vu dans les dicaryons. Il est évident qu'une analyse plus poussée serait nécessaire pour en être certain car la fréquence de cette transformation est assez variable (GUERDOUX 1971).

Par contre, nous avons observé des souches fn : cette transformation $F \rightarrow fn$ n'avait pas été jusque là rencontrée. Nous reviendrons sur ce point dans un autre article. A nouveau, la transformation F en fn semble être intrinsèque, puisqu'elle se produit dans des conditions d'homozygotie.

L'absence de réversion des souches diploïdes en phase végétative, alors que de nombreux révertants sont observés à la méiose permet d'exclure que la réversion soit liée à l'état diploïde per se. Elle se produirait donc soit après soit pendant la méiose. L'analyse de la réversion dans un dicaryon diploïde -haploïde devrait permettre de savoir si l'appariement est ou non nécessaire pour obtenir des sauvages dans un croisement homozygote mutant.

REMERCIEMENTS

Je remercie Mademoiselle Michèle MASSON, Madame Evelyne SHECHTER et Madame Monique SCHMALTZ qui ont participé, à des titres divers, à la réalisation de ce travail.

REFERENCES

BRYGOO, Y. : Communication personnelle.

GUERDOUX, J.L. : Réversion à haute fréquence d'un gène nicotinique moins chez le *Coprinus radiatus*. Molec. Gen. Genetics 105, 334-343 (1969).

——— : Modification de la haute fréquence de réversion du mutant nicotinique deux chez le *Coprinus radiatus*.

1. Mise en évidence de trois types de souches donnant une réversion plus ou moins élevée. *Molec. Gen. Genetics* (sous presse) 1971.

MOTTA, R. : Communication personnelle.

PREVOST, G. : Etude génétique d'un Basidiomycète : *Coprinus radiatus* Fr. ex. Bolt. Thèse Paris 1962.

PRUD'HOMME, N. : Etude de recombinaisons nucléaires extra-basidiales chez *Coprinus radiatus*. Thèse Paris 1966.

—— : Recombinaisons mitotiques chez un basidiomycète *Coprinus radiatus*. *Molec. Gen. Genetics* 107, 256-271 (1970).

J.L. GUERDOUX

Centre de Génétique Moléculaire

91 - Gif sur Yvette/FRANCE

Communicated by

Tableau n°1 : Analyse de la réversion des souches nic⁻ h.

souche nic ⁻ h n°	:	:	:	:	:
	:	49	:	53	:
	:		:	58	:
	:		:	69	:
	:		:		:
analyse en tétrades	:	6 tétr. 4 nic ⁻	:		:
	:	3 tétr. 3 nic ⁻ 1 nic ⁺	:		:
	:	1 tétr. 2 nic ⁻ 2 nic ⁺	:		:
	:		:		:
	:		:		:
réversion observée sur les	:		:		:
sporées étalées en masse	:	0.11	:	0.32	:
	:		:	0.22	:
	:		:	0.07	:

Tableau n°2 : étude des souches nic-2 ayant produit peu de révertants.

	:	réversion		
	:			
souche nic-2 h n°	:	:	x TT*	
	:	:		
	:	x nic-2 iso-2	Mn/Nic	Ad/Adnic
	:			
71	:	0,02	2/320	45/780
	:			
74	:	0,09	pas obtenue	
	:			
96	:	0,08	1/420	55/536
	:			

* TT : souche ad⁻ nic F "testeuse".

Tableau n°3 : Identification des souches diploïdes.

souches mixées	:	nombre de thalles nains (haploïdes)	:	nombre de thalles sauvages (dicaryotiques ou diploïdes)
dicaryons *	:	768	:	9
diploïdes *	:	16	:	625
$\frac{\text{on} \text{ nic col}^+}{\text{on}^+ \text{ nic col}}$ présumés diploïdes	A-1	1	:	48
	B-1	0	:	30
	B-3	0	:	35
	:	:	:	:

A-1 : colonie issue du mixage d'un premier secteur à aspect diploïde

B-1 et B-3 : colonies issues du mixage d'un deuxième secteur à aspect diploïde.

* Ces résultats, auxquels nous nous référons, ont été obtenus par N. PRUD'HOMME (1970).

Tableau n°4 : Tétrades issues de souches diploïdes nic-2F.
nic-2F

nombre de spores		tétrades issues du diploïde		"réversions" *		"germinations" *	
germées	sauvages et mutantes	B-1	B-3	observée	théorique	observée	théorique
4	4 ⁻	1	3	4	2.5	14	7.4
	3 ⁻ 1 ⁺	7	0	7	5.3		
	2 ⁻ 2 ⁺	1	2	3	4.2		
	1 ⁻ 3 ⁺	0	0	0	1.5		
3	3 ⁻	1	2	3	4.7	17	22
	2 ⁻ 1 ⁺	4	5	9	7.6		
	1 ⁻ 2 ⁺	1	4	5	4.1		
2	2 ⁻	2	2	4	8.9	21	24
	1 ⁻ 1 ⁺	6	7	13	9.5		
	2 ⁺	1	3	4	2.5		
1	1 ⁻	3	1	4	4.6	7	11.4
	1 ⁺	1	2	3	2.3		
0		2	6	8		8	2
nombre de souches +		24	31				
nombre de souches germées		76	80				
nombre de spores ensemencées		124	148				
germination		0,61	0,54				
réversion		0,32	0,39				

fréquence de réversion globale : 0,35

" " " germination " : 0,58

* distributions des différents types de tétrades, en ce qui concerne la réversion ou la germination..

Les résultats du diploïde B-3 sont la somme de 2 séries de tétrades prélevées sur des fructifications indépendantes.

ANNEXE 6

Mise en évidence d'une transformation $\underline{F} \rightarrow \underline{fn}$.

Les croisements $\underline{fa} \times \underline{F}$ que nous avons étudié, donnent tous naissance à des souches $\underline{fn}$. La transformation $\underline{fa} \rightarrow \underline{fn}$ à la méiose est bien établie. Par contre, l'analyse des descendants d'un croisement $\underline{F} \times \underline{F}$ avait été conduite de telle façon qu'il était quasi impossible de déceler des souches faibles neutres parmi eux.

Nous avons vu (article 3) que deux souches $\underline{fn}$ ont été mises en évidence dans la descendance d'une souche $\underline{nic-2 F h}$.

Nous avons recherché si un dicaryon $\underline{F} \times \underline{F}$ pouvait donner également naissance à des souches $\underline{fn}$ comme une souche homothallique le fait. L'expérience réalisée est simple, grâce à l'utilisation des souches $\underline{ad-9 nic-2 F}$. Les souches "testeuses" ont été croisées à 56 souches dont 55 étaient $\underline{F}$ (réversion élevée sur milieu sans adénine). La dernière doit être considérée comme $\underline{fn}$ (2 révertants sur 136 individus étalés sur milieu sans adénine, 85 sur 244 en présence d'adénine).

L'apparition de $\underline{fn}$ n'est donc pas liée à la présence d'un allèle $\underline{fa}$ dans un croisement et la transformation $\underline{F} \rightarrow \underline{fn}$ est à ajouter à celles que nous connaissions déjà.

ANNEXE 7

Compléments à l'étude des sauvages illégitimes

La croissance des sauvages illégitimes est tout à fait semblable à celle de la souche sauvage de référence. Ceci n'est, bien entendu, pas suffisant pour conclure à leur identité. Divers critères seraient possibles à envisager : nous avons, pour le moment, étudié la stabilité méiotique des sauvages illégitimes et le résultat de leur croisement avec des souches nic-2 F ou nic-2 fa.

Stabilité des sauvages illégitimes.

Les résultats décrits dans l'article 3 suggéraient que des sauvages de tétrades aberrantes, croisées entre eux, ne redonnent pas des souches auxotrophes. Cependant, le nombre restreint d'individus étudiés, et l'incertitude quant à la nature "illégitime" des sauvages, ne permettaient pas une conclusion définitive.

Nous avons donc croisé des sauvages issus de nic-2 iso-2 (2) x nic-2 iso-2 (3) entre eux. Un nombre variable de spores ont été étudiées dans cinq descendance indépendantes et aucun individu nicotinique moins n'a été observé sur 293 souches analysées.

La réversion (nic⁻ → nic⁺) ne donne donc pas des sauvages pouvant, symétriquement (nic⁺ → nic⁻), redonner naissance à des individus mutants, avec une fréquence élevée : au seuil de 5 %, la limite supérieure de la fréquence de ce type de phénomène serait de 0,0125, donc notablement différente de la fréquence élevée de réversion (0,23).

Ce résultat n'exclue pas la possibilité d'instabilité des sauvages illégitimes avec une fréquence inférieure. Le nombre d'individus observés est également insuffisant si l'on veut s'intéresser à d'éventuelles recombinaisons intragéniques, la "taille" des gènes du Coprin étant petite : le locus ur-1 (GANS, MASSON 1969) par exemple correspond au maximum à environ 0,04 UR.

Croisements entre souches nic⁻ et sauvages.

Le tableau 1 résume ce que nous avons observé (article 4) dans des croisements entre sauvages illégitimes issus de nic-2 F x nic-2 F et souche sauvage de référence d'une part, souches nic-2 F et nic-2 fa d'autre part. Il donne également les résultats de croisements entre ces dernières

et des sauvages illégitimes issus de nic-2 fn x nic-2 fn.

Quelle que soit l'origine des sauvages illégitimes, ils se comportent strictement comme la souche sauvage de référence, des tétrades irrégulières étant observées en grand nombre dans les croisements avec nic-2 F, très rarement dans les croisements avec nic-2 fa.

Conclusion.

Les sauvages illégitimes sont apparemment stables à la méiose. Ils se comportent comme la souche sauvage habituelle dans les croisements avec les souches nic-2 F et nic-2 fa.

Les sauvages issus d'un croisement homozygote nic⁻ sont donc, par ces critères, à considérer comme étant identiques à la souche sauvage de référence.

Référence.

GANS, M. et MASSON, M. : Structure fine du locus ur-1 chez *Coprinus radiatus*.
M.G.G. vol. 105, 164-181. (1969).

Tableau n°1 : Croisements entre souches nic⁻ et sauvages.

SSR *	nic-2 F		nic-2 fa	
	Tétrades 2/2	Tétrades 3/1 et 4/0	Tétrades 2/2	Tétrades 3/1 et 4/0
	21	14	47	1
(+) issus de nic-2 F x nic-2 F	61	56	132	2
(+) 421/1	3	2	24	0
issus 465/1	16	8		
de 466/1	13	6		
ic-2 fn 466/3			25	0
x 469/1	4	0		
ic-2 fn 469/3	7	5		

* résultats obtenus précédemment (article 4).

SSR : souche sauvage de référence.

ANNEXE 8

Recombinaisons entre marqueurs encadrant nic-2, dans un croisement homozygote mutant.

A l'état hétérozygote, nic-2 ne modifie pas la distance génétique entre les marqueurs col et ad-9 qui l'encadrent. Un indice de modification de cette distance dans des deux croisements homozygotes avait été recueilli (article 4, tableau 12), en analysant des spores repiquées une à une. Nous avons mesuré à nouveau la réversion de l'un des croisements (n°220).

Les spores ont été repiquées dès qu'elles étaient visibles sur le milieu à germination, pour conserver le maximum de milieu nutritif aux spores à germination tardive. Pour la même raison, les boîtes de Pétri utilisées contenaient deux fois plus de milieu.

Le tableau n°1 résume cette expérience. Les spores porteuses de plusieurs mutations ont tendance à germer en retard, en particulier les individus de génotype ad-9 nic-2. Ceci introduit un biais dans les estimations des fréquences de réversion et de recombinaison, si l'on ne s'intéresse qu'aux individus à germination précoce.

Si on étudie toutes les spores aptes à germer, la distance col ad trouvée (18.4 UCO) est voisine de celle de la carte (20 UCO, G. PREVOST 1962). En première approximation, nous considérons donc que la recombinaison entre col et ad n'est pas modifiée par la présence de nic-2 à l'état homozygote.

Cette expérience montre également que la réversion se produit avec une fréquence non statistiquement différente chez les individus ayant ou non subi un remaniement chromosomique décelable entre les marqueurs encadrant nic-2.

Enfin, elle indique que la comparaison directe entre les nombres d'individus observés sur milieu minimum et sur milieu supplémenté en adénine peut être un bon moyen d'estimation de la symétrie de la réversion, en particulier dans les expériences d'étalement en masse des spores.

Même après une germination relativement courte (5 jours) on trouve

dans ce croisement un indice correct de la symétrie de la réversion : les ad⁺ nic⁺ (observés sur milieu Mn lorsque l'on étale les spores en masse) sont au nombre de 25 alors que le total des révertants (observés sur milieu supplémenté en adénine dans les mêmes conditions) censé être égal au double dans l'hypothèse de la symétrie soit donc 50, est égal à 43.

Ceci est intéressant si l'on veut, aux moindres frais, connaître la symétrie de la réversion dans un croisement nic⁻ x ad⁻ nic⁻.

REFERENCE.

G. PREVOST : Etude Génétique d'un Basidiomycète : "Coprinus radiatus"
Fr. ex. Bolt. Thèse de Doctorat PARIS (1962).

Tableau n° 1 : Fréquences de réversions et de recombinaisons d'un croisement col nic-2 ad-9 x nic-2.

génotype des spores	≤ 5 jours		génotype des spores	> 5 jours		total	
	effectif	réversion		effectif	effectif	réversion	
nic	90	0.174	nic	2	92	0.172	
+	19		+	0	19		
colnicad	12	0.480	colnicad	27	39	0.278	
col ad	13		col ad	2	15		
col nic	12	0.333	col nic	4	16	0.273	
col	6		col	0	6		
ad nic	4	0.555	ad nic	7	11	0.313	
ad	5		ad	0	5		
total	161				203		distance col ad
		distance colad : 16.7					
recombinés	27				38		18.4

I-2 RESUME DES RESULTATS EXPERIMENTAUX

RESUME DES RESULTATS EXPERIMENTAUX

1 - Tétrades à ségrégations non 2 nic^+ 2 nic^- dans les croisements entre nic-2 et la souche sauvage de référence (article 1)

Les croisements de nic-2 avec la souche sauvage de référence donnent environ 50 % de tétrades $2^+ 2^-$ et 50 % de tétrades avec 3 ou même 4 individus prototrophes, que la souche nic-2 utilisée soit la souche de départ ou une souche isogénisée.

Ce résultat peut indiquer que la souche nic-2 est porteuse de deux mutations (a et b), chaque simple mutant $a^+ b$ et $a b^+$ était indistinguishable de la souche ne portant aucune des deux mutations ($a^+ b^+$).

Des croisements des individus sauvages de tétrades anormales avec les souches nic-2 compatibles ou avec d'autres individus sauvages analogues ont été réalisées. Dans l'hypothèse envisagée, certains des premiers croisements ($a b^+ \times a b$) auraient dû ne donner que des tétrades $2^+/2^-$. Parmi la descendance de certains des seconds ($a b^+ \times a^+ b$), on aurait dû trouver des individus auxotrophes. Aucune de ces deux propositions ne s'étant réalisée, l'intéressante (au point de vue physiologique) mais simple hypothèse envisagée est donc à rejeter. De même nous avons pu rejeter l'hypothèse d'une situation trigénique.

2 - Apparition de sauvages dans des croisements nic-2 iso-2 $\times$ nic-2 iso-2 (article 1) et dans des fructifications de souches homothalliques (article 3)

2 - 1. Mise en évidence

Sur une suggestion de K.C.ATWOOD (ATWOOD communication personnelle), nous avons isolé des tétrades d'un dicaryon homozygote mutant : des individus sauvages, indistinguishables de la souche de référence furent obtenus.

Pour pouvoir éliminer définitivement toute hypothèse polygénique complexe, qu'il devenait difficile à soutenir à ce moment de nos expériences, mais dont on peut toujours soupçonner l'existence lorsque les souches croisées ne sont pas parfaitement isogéniques, nous avons ensuite étudié la réversion de nic-2 dans des souches homothalliques : en l'absence de possibilité de ségrégation, des individus révertants furent isolés, leur fréquence étant du même ordre que précédemment.

2 - 2. Stabilité méiotique des révertants.

Nous avons recherché si les sauvages illégitimes étaient stables à la méiose (annexe 7). Trois cents individus environ, issus de cinq croisements entre ces sauvages ont été analysés, sans qu'aucun individu nic⁻ réapparaisse. Une expérience sur un nombre plus important de descendants devra être faite, mais, dès à présent, on peut être certain que la réversion (nic⁻ $\rightarrow$ 0,20 nic⁺) ne donne pas naissance à des sauvages instables, retournant avec une haute fréquence à l'état nic⁻ (la fréquence maximale de cet événement, mesurée sur 300 individus étant de $1, 2 \cdot 10^{-2}$).

3 - Stabilité végétative de nic-2 et des sauvages qui en sont issus.

La souche nic-2 de départ existe, nous l'avons dit plus haut, dans la collection du laboratoire depuis plusieurs années : elle a donc été repiquée de nombreuses fois et n'en a pas moins gardé son phénotype. Depuis que nous l'étudions, nous n'avons jamais noté d'instabilités mitotiques, dans les souches que nous avons utilisé, dans les repiquages à partir de thalles. Sur milieu de germination, les spores se développent en donnant des colonies homogènes, sans trace de secteur à croissance plus ou moins rapide.

Des mixages de thalles haploïdes, dicaryotiques et diploïdes (article 3) mutants ont été réalisés. Aucun individu sauvage n'en a été isolé. Ceci montre la parfaite stabilité de nic-2 en phase végétative contrairement à son instabilité méiotique.

Nic-2 n'est pas particulièrement sensible aux agents mutagènes : l'irradiation aux U.V. ou un traitement par la nitrosoguanidine (MASSON communication personnelle) donne peu de révertants : ils n'ont pas encore été étudiés.

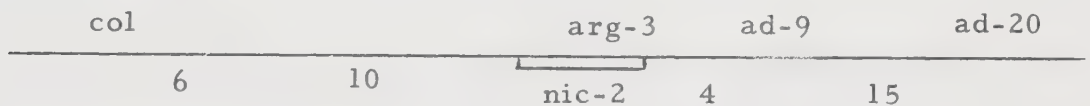
De même, autant que l'on puisse juger, les individus prototrophes issus de nic-2 sont stables en phase végétative : ils croissent toujours sur milieu synthétique minimum même après de nombreux repiquages sur milieu complet.

4 - Localisation de nic-2 (article 1)

Rien n'empêchant de considérer le phénotype mutant comme étant dû à l'altération d'un seul gène, il était justifié de tenter de le localiser. La série de croisements faisant intervenir les différents gènes marqueurs de sept des huit chromosomes du Coprin n'a pas montré de liaison entre nic-2 et ces derniers. Par contre, les

croisements entre souches nic-2 et souches porteuses de mutations localisées sur le chromosome II montrent que les associations parentales de gènes sont nettement majoritaires. Nic-2 a été localisé par un test trois points entre le centromère du chromosome II et un gène ad-9 localisé à 14 U.R. de ce dernier (article 1 tableau 4). La distance nic-2 ad-9 est de 4 U.R. si on ne considère que les tétrades à ségrégations 2/2. Nos tentatives de localisation plus précise de nic-2 par rapport au gène arg-3 (situé à 10 U.R. du centromère) ont échoué : une souche nic-2 arg-3 a pu être isolée mais la germination des spores arg-3 s'est avérée par la suite très mauvaise. Trois essais successifs de croisements avec col ont donné trop peu de tétrades complètes. Cependant la découverte des souches nic-2 à faible réversion (voir plus loin) nous permettra peut être d'obtenir une localisation plus précise : un test trois points, col arg-3 x nic-2 devrait permettre, en dénombrant par simple étalement les spores prototrophes cette fois, de ne pas être gêné par les mauvaises germinations des auxotrophes et de déterminer précisément la position de nic-2 par rapport à arg-3.

Ces imprécisions n'empêchent pas d'avoir obtenu le rattachement de nic-2 à un groupe de liaison connu, marqué par plusieurs gènes dont la ségrégation est normale (dessin ci-dessous) dans les croisements faisant intervenir nic-2.



5 - Réversion et recombinaison (article 1 et 2, annexe 7)

Dans les croisements hétérozygotes pour nic-2 étudiés en tétrades, les distances génétiques sont conservées. (col ad-9 = 21, ad-9 ad-20 = 13 - article 1, tableaux 4 et 5).

L'analyse spore par spore de croisements homozygotes nic-2 (article 2 tableau 12) donne une distance col ad faible (15 U.R.) : nous avons montré (annexe 7) que cela n'est probablement dû qu'à des retards de germination d'individus recombinants.

Nos expériences ne peuvent, bien entendu, pas exclure la possibilité d'une action de nic-2 sur la recombinaison : elle ne pourrait être que faible.

Nous avons recherché ensuite si la réversion était corollaire d'un échange de marqueurs externes : les individus révertants possèdent aussi bien des associations parentales que recombinées des gènes marqueurs col et ad, que ce soit dans un croisement où nic-2 est hétérozygote (article 1 tableau 4) ou un croisement où nic-2 est à l'état homozygote (annexe 7 tableau 1). Bien qu'à nouveau on ne puisse être certain (article 1) qu'aucun lien ne relie les deux phénomènes, il apparaît clairement que la réversion n'est pas le produit direct d'une recombinaison réciproque entre chromatides non sœurs.

6 - Détermination de la fréquence de réversion élevée.

Une récapitulation des résultats que nous présentons dans les divers articles et annexes a été faite. La meilleure estimation de la réversion est obtenue en analyse de tétrades, lorsque la fréquence de germination est élevée, ce qui est généralement le cas. On ne conserve alors que les résultats des tétrades complètes. Les fréquences de réversion observées sont de 0,20 sur 308 individus dans les croisements hétérozygotes pour nic-2 ($0,20 \pm 0,025$) et de 0,245 sur 780 individus dans les croisements homozygotes ($0,245 \pm 0,015$). Ces résultats ne sont pas significativement différents et leur regroupement a été fait : la réversion se produit avec une fréquence de 0,23, l'intervalle de confiance au seuil de 1 % étant de 0,20 à 0,26.

Lorsque les spores sont repiquées une à une et non plus en tétrades (tableaux 12 et 13 de l'article 2, tableau 1 de l'annexe 7, et dans le texte de l'article 3) on trouve une réversion de 0,27 sur 1003 individus, fréquence qu'il est raisonnable d'identifier à la précédente : elle est probablement légèrement surévaluée à cause de différences de germination (voir annexe 7).

La variabilité des fréquences obtenues par étalement direct des spores en masse est plus grande, ce qui n'est pas étonnant car les germinations propres aux divers génotypes peuvent être variables sans pouvoir être estimées dans ces techniques.

Rien n'indique cependant que certains croisements aient des fréquences de réversion significativement plus élevée que d'autres.

En première approximation, nous considérerons donc que la réversion élevée se produit dans tous les croisements avec une fréquence de 0,23, valeur trouvée dans les analyses de tétrades.

7 - Mise en évidence des souches fa et F. (article 2)

Nous avons, par hasard, (article 2 tableau 2), rencontré un croisement possédant une fréquence de réversion très inférieure à celles observées habituellement. Ceci nous a conduit à rechercher systématiquement des cas de réversion faibles. Nous en avons rencontré plusieurs qui se répartissent en deux groupes (en excluant les erreurs expérimentales).

Le premier groupe rassemble les cas de faibles réversions accidentelles (ou "accidents") : un croisement qui donne habituellement de fortes réversions montre parfois une réversion faible (voir paragraphe suivant)

Le deuxième groupe réunit des croisements donnant systématiquement des faibles réversions, lorsqu'ils sont répétés. Nous avons

pu montrer (article 2) qu'il ne s'agissait pas d'une qualité du couple de génomes en présence. Les faibles réversions permanentes sont dues à l'existence de souches haploïdes très particulières que nous avons appelées "faibles agressives" (nic-2 fa ou fa). Quelque soit leur partenaire, ces souches fa imposent une faible réversion à toutes les fructifications (annexe 2 tableau 6). Les autres souches croisées entre elles, donnent une réversion élevée de l'ordre de la valeur moyenne définie plus haut (0,23). Nous les avons appelées "fortes" (nic-2 F ou F).

Les souches fa que nous avons étudiées proviennent de sporées issues de croisements nic 2 iso 2 x nic 2 iso 2, mais nous en avons rencontré quelques unes venant de croisement ad nic 2 x nic 2 iso 2 (voir généalogie des souches : fig. 1 de l'article 2). Nous avons montré, par analyse de tétrades, que la réversion ($F \rightarrow +$) et la transformation $F \rightarrow fa$ étaient indépendantes : les mutants peuvent ou non voisiner avec des fa dans une tétrade, les deux événements ne sont donc pas symétriques et ils ne s'excluent pas mutuellement.

Un dicaryon fa x F donne toujours une réversion faible. Celle-ci est variable. Les valeurs supérieures de la réversion observée semblent être une caractéristique de la souche fa (annexe 4 figure 1). Ainsi a-t-on noté une fréquence de réversions entre 10^{-4} et 10^{-1} dans 20 fructifications dans le cas d'une première souche fa, alors que les fréquences de réversion observées dans 23 fructifications d'un croisement impliquant une deuxième souche fa sont toujours inférieures à 10^{-2} .

Il est certain qu'il sera nécessaire de vérifier ce point en étudiant de nombreuses fructifications indépendantes, et aussi de préciser le rôle respectif des parents fa et F en cherchant à savoir si ce dernier peut aussi intervenir dans les variations observées.

Un autre point n'a fait l'objet que d'une première expérience (annexe 4 tableau 3) : 6 fructifications d'un dicaryon :

<u>ad⁺</u>	<u>nic-2 fa</u>
<u>ad⁻</u>	<u>nic-2 F</u>

ont été analysés et l'on a observé une dissymétrie dans la réversion, tous les révertants (66 sur 66) provenant du génome nic-2 F.

Le caractère faible réversion du génome fa ne se manifeste pas qu'en présence d'un génome F : sur un total de 182 tétrades issues de croisements fa x sauvage (de référence ou illégitime) (article 2 tableau 8), 3 seulement étaient à ségrégation irrégulière (3 nic⁺ 1 nic⁻). Cette expérience ajoute de plus, un critère d'identité entre sauvages illégitimes et souche sauvage de référence, les croisements de ces 2 types de souches avec fa donnant le même résultat.

8 - Faibles réversions accidentelles (article 2)

- 98 -

Nous avons dit qu'un dicaryon $\underline{F} \times \underline{F}$ donne, en général, des fréquences de réversions d'environ 0,23, mais que, parfois, des réversions plus faibles étaient observées. Il nous a semblé légitime de rapprocher ces faibles réversions accidentelles de la transformation $\underline{F} \rightarrow \underline{fa}$, et de leur chercher une interprétation commune.

$\underline{fa}$ n'étant pas stable à la méiose, on peut envisager que cette transformation se produit en cours de mitoses.

Cela peut se produire au niveau du dicaryon. Celui-ci sera alors une mosaïque pour l'un des génomes parentaux, certains noyaux étant $\underline{fa}$, les autres étant restés $\underline{F}$. Seules certaines fructifications donneront de faibles réversions, d'où les faibles réversions accidentelles dont nous ne percevons que les cas très tranchés, les autres pouvant être rangés parmi des variations aléatoires de nos mesures. Ces dernières n'étant néanmoins pas très fortes, on peut penser que les faibles réversions accidentelles ne sont pas très nombreuses, donc que la transformation $\underline{F} \rightarrow \underline{fa}$ est rare en cours de multiplication végétative des dicaryons $\underline{F} \times \underline{F}$.

Si la transformation se produit tôt dans les mitoses d'une souche haploïde, la plupart des noyaux seront $\underline{fa}$ et l'on observera des faibles réversions permanentes.

9 - Souches $\underline{fn}$. (article 2 et 3)

Dans la descendance d'un dicaryon $\underline{fa} \times \underline{F}$, existent des individus qui, croisés entre eux, donnent de faibles réversions (article 2 tableau 9) et lorsqu'on les croise à des souches $\underline{F}$, des réversions nettement supérieures aux fréquences de dicaryons $\underline{fa} \times \underline{F}$. Nous avons interprété ces deux résultats en admettant la perte, au cours de la méiose, du caractère agressif, et la transformation de $\underline{fa}$ en un nouveau type "faible neutre" ($\underline{fn}$).

Nous avons vérifié cette interprétation en utilisant des souches dites "testeuses", $\underline{ad-9 \ nic-2 \ F}$: leur utilisation permet d'affecter les révertants à l'un ou l'autre des allèles en présence, $\underline{ad-9}$ étant seulement à 4 VR de $\underline{nic-2}$. Par exemple, dans la descendance d'un dicaryon $\underline{ad-9^+ \ nic-2 \ fn}$ les $\underline{ad^+}$ sont rarement $\underline{nic^+}$ alors que l'on en observe 20 % parmi les $\underline{ad^-}$ ($\underline{ad-9 \ nic-2 \ F}$) (article 2 tableaux 11 et 13).

Des souches issues d'un génome $\underline{fa}$ donnent ce type de résultat, ce qui confirme la perte du caractère agressif pendant la méiose.

Cette perte a été observée que la souche $\underline{fa}$ soit croisée à une souche $\underline{F}$, à un sauvage illégitime, à une souche $\underline{fn}$ (annexe 3 tableau 1) ou même à une autre souche $\underline{fa}$: le caractère agressif ne

se conserve donc pas à la méiose alors que les souches fa restent telles au cours des repiquages et de la multiplication végétative.

Nous n'avons pas démontré que, systématiquement, fa est transformé en fn, mais nous pouvons dire que cette transformation se produit avec une fréquence importante.

Nous avons recherché si la transformation $\underline{F} \rightarrow \underline{fn}$ était possible: 3 souches fn issues d'une souche nic-2 F homothalliques (article 3) ou d'un dicaryon $\underline{F} \times \underline{F}$ (annexe 5) ont été mises en évidence par croisements avec des souches ad⁻ nic-2 F. La transformation est donc possible même si elle n'est pas très fréquente.

Il est également possible que cette transformation se produise dans un dicaryon fa $\times$ F : nous avons pu montrer (annexe 4) que certains croisements de ce type ségrégeaient des souches F mais nous avons constaté leur absence dans certains autres croisements. Les expériences sur ce point doivent être développées pour qu'une conclusion nette puisse être donnée.

L'utilisation des souches ad-9 nic-2 F permettra de savoir si la transformation de F en fn est, ou non, plus fréquente dans un dicaryon fa $\times$ F que dans un croisement F $\times$ F.

Enfin, un dicaryon fn $\times$ F ségrège des souches fn (article 2 tableau 11). Nous avons vérifié la stabilité de fn dans cette combinaison : 9 souches ad⁺ issues d'un dicaryon fn $\times$ ad⁻ F ont été étudiées et classées comme fn.

10 - Absence d'indication d'hérédité cytoplasmique (annexe 3)

La perte du caractère agressif à la méiose pouvant suggérer l'existence d'une composante cytoplasmique dans le phénomène étudié, nous avons recherché son existence par trois méthodes différentes.

Tout d'abord, nous avons tenté de démontrer l'existence d'un élément infectieux, en réalisant des dicaryons, fa $\times$ F et fa $\times$ fn. Ces dicaryons ont été mixés pour obtenir les génomes haploïdes. Malgré la mise en présence dans un cytoplasme commun, les fa, les F et les fn ont gardées leurs caractéristiques propres.

Nous avons ensuite réalisé des croisements réciproques, en spermatisant des articles mycéliums par des oïdies pauvres en cytoplasme : nous n'avons trouvé aucune différence, le caractère fa se transmettant parfaitement dans les deux cas.

L'influence du bromure d'éthidium (connu pour son action sur les ADN cytoplasmiques) sur la réversion, a été étudié : des expériences préliminaires, sur les divers dicaryons envisageables, n'ont pas montré une quelconque action.

Ces trois résultats, indépendamment des uns des autres auraient peu de signification. On peut en effet dire que la dédicarboxylation est trop brutale pour qu'une éventuelle infection puisse être détectée. On peut également envisager la possibilité de transfert de certaines macromolécules par les oïdies. Les expériences en présence de bromure d'ethidium sont, quant à elles trop préliminaires pour y attacher beaucoup d'importance.

Néanmoins, la convergence des résultats négatifs de ces trois types d'expériences, fait qu'il nous semble actuellement peu probable qu'un élément purement cytoplasmique soit responsable de la réversion.

11 - Récapitulation des avatars de nic-2.

Il nous a semblé utile de faire une récapitulation des faits expérimentaux que nous venons de décrire. Le point n° 1 (nic-2 x iso-10 $\rightarrow$ tétrades irrégulières) est le point de départ de nos expériences : il a été établi à de nombreuses reprises. La fréquence de réversion élevée (2) est en bonne approximation homogène.

Les transformations $\underline{F} \rightarrow \underline{fa}$ (3) et $\underline{F} \rightarrow \underline{fn}$ (4) (méiotiques ou mitotiques ?) sont bien établies, de même que la transmission méiotique régulière de $\underline{F}$ (5). La fréquence de réversion de croisements comportant une $\underline{fa}$ est faible et variable (6). Elle semble dépendre de la souche $\underline{fa}$ utilisée.

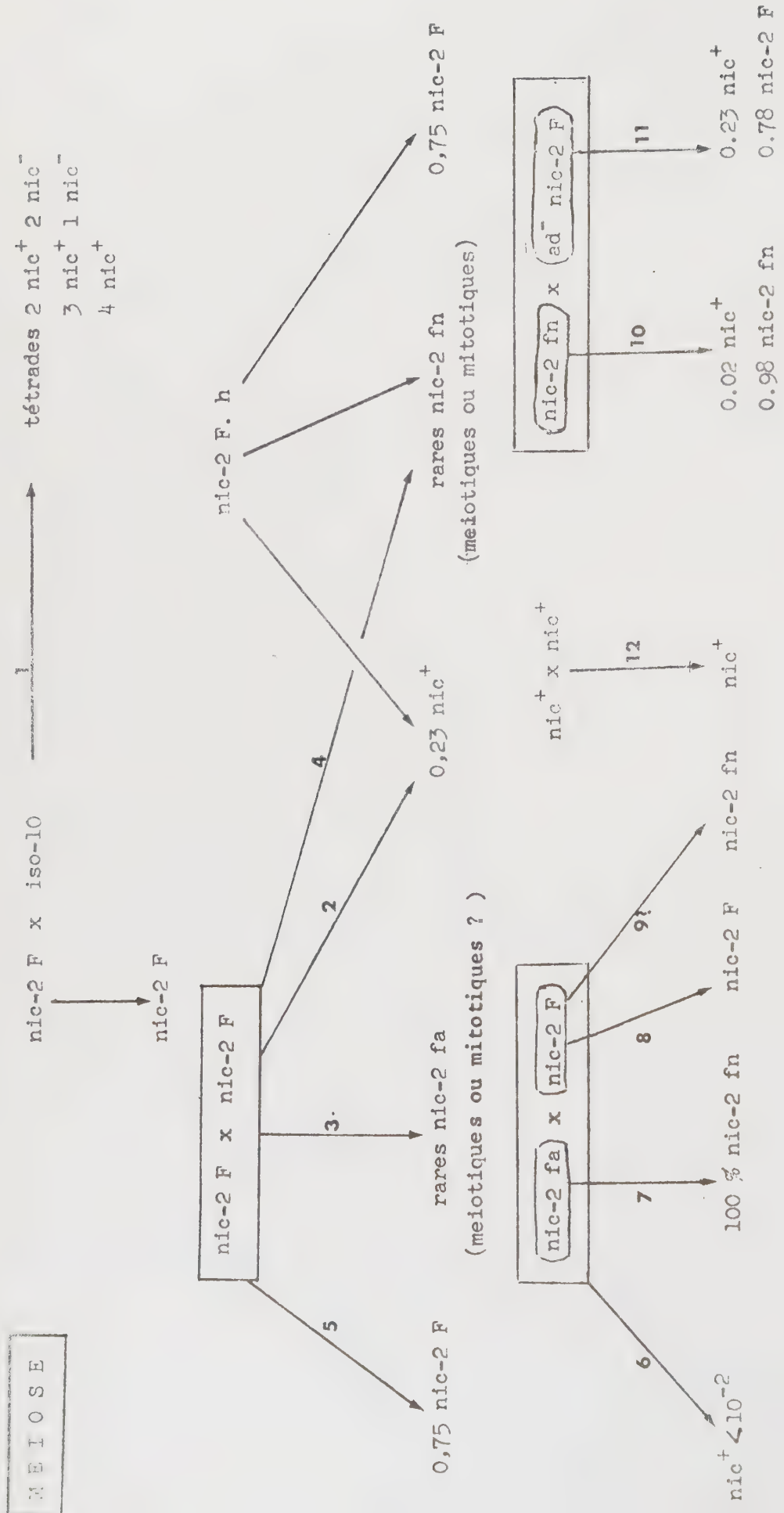
Nic-2 fa ne passe pas la méiose et est transformé avec une très grande fréquence (100 % ?) en nic-2 fn (7). Un croisement nic-2 fa x nic-2 F peut ségréger des nic-2 F (8), mais il est possible que, avec une fréquence variable selon le croisement, $\underline{F}$ soit transformée en $\underline{fn}$ (9). Dans un croisement nic-2 fn x nic-2 F chaque génome réverse indépendamment et les souches qui en sont issues gardent les caractères parentaux (10. 11).

Les révertants sont stables à la méiose : 300 descendants de (+) x (+) ne redonnent pas de nic⁻ (12).

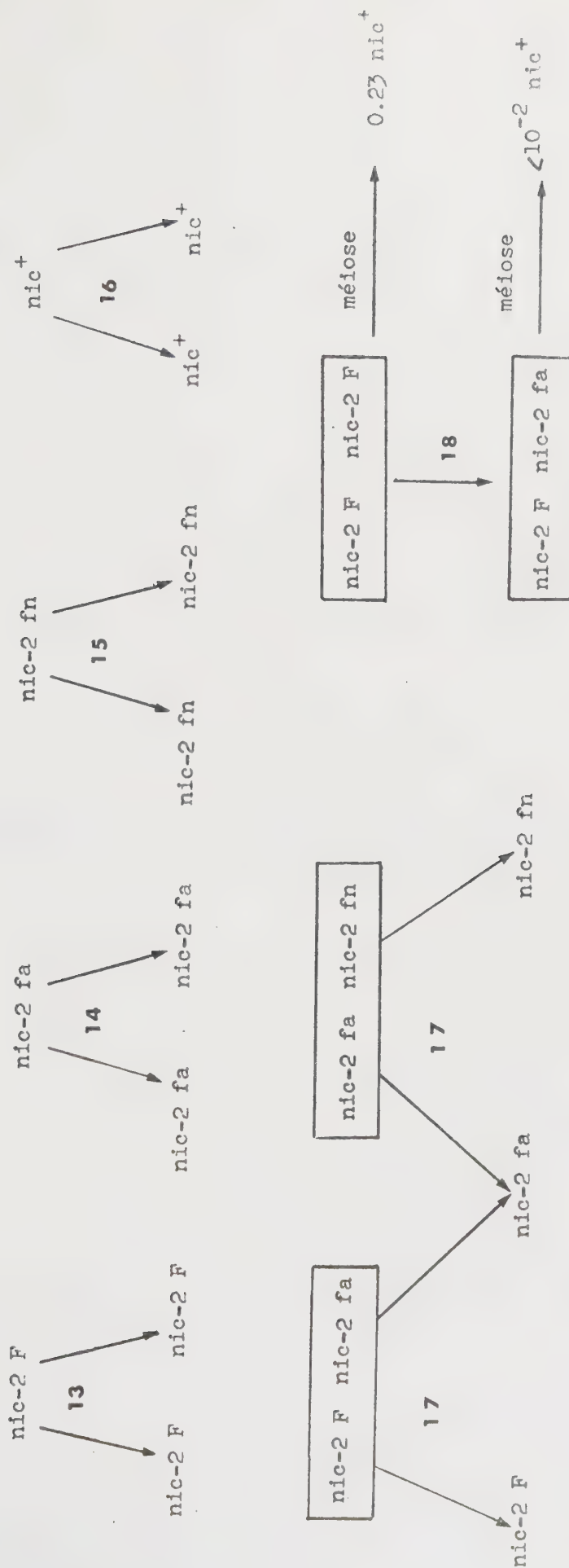
Les souches auxotrophes et prototrophes ne montrent pas de changement en cours de mitose. La stabilité végétative de la forme $\underline{F}$ (13) peut n'être que relative (18), le moment des transformations $\underline{F} \rightarrow \underline{fa}$ et $\underline{F} \rightarrow \underline{fn}$ n'ayant pas été déterminé.

Celles des formes $\underline{fa}$ (14), $\underline{fn}$ (15) et (+) (16) doit être suffisante pour que nous n'ayons pas noté de différence lors de l'utilisation répétée des souches en question (ceci étant surtout vrai pour $\underline{fa}$).

Enfin les différentes formes ne se transforment pas mutuellement lorsqu'elles sont mises en présence dans un même cytoplasme (17)



MITOSE



II - EXEMPLES DE GENES INSTABLES

II - EXEMPLES DE GENES INSTABLES

1. Augmentation de la fréquence de réversion par les gènes mutateurs.
2. Instabilités dues au crossing over inégal.
3. Instabilités dues à des accidents chromosomiques.
4. Les gènes à expression variable.
5. Instabilités dues à des éléments transposables.
6. Paramutation.

II - EXEMPLES DE GENES INSTABLES

Les résultats expérimentaux que nous venons de décrire, font rentrer nic-2 dans la grande famille des gènes instables. Depuis le premier exemple décrit (CORRENS, 1902) de nombreux cas d'instabilité génétique ont été découverts. Certains sont dus à la modification du gène lui-même sous l'influence de gènes mutateurs ou du crossing over inégal ; d'autres correspondent à la modification de l'expression du gène, à la suite par exemple, d'accidents chromosomiques ou de la présence d'éléments transposables.

Nous allons, sans chercher à en faire une liste exhaustive, décrire quelques exemples représentatifs d'instabilité génétique.

Les cas réellement cytoplasmiques, tels les mitochondries (par exemple COEN et al. 1969) les chloroplastes (par exemple SAGER 1965), ne seront pas envisagés, la réversion de nic-2 ne pouvant être purement et simplement cytoplasmique.

II - 1 - Augmentation de la fréquence de mutation par les gènes mutateurs

Une caractéristique de la réversion de nic-2 est sa grande fréquence. La fréquence de mutation peut être augmentée par les gènes mutateurs (TRIFFERS et al. 1954), qui provoquent des modifications de l'ADN, soit en faisant accumuler un analogue de base soit en produisant une enzyme modifiée, intervenant dans le métabolisme de l'acide nucléique. En tous cas, on a montré qu'ils agissent sur de nombreux allèles (ZAMENHOF 1970, MIYAKE 1960) et pour deux d'entre eux (COX et YANOFISKY et al. 1966 ; SIEGEL et BRYSAAR 1967) qu'ils produisent des transversions (AT → GC).

II - 2 - Instabilités dues au crossing over inégal

L'apparition d'individus sauvages (réversion) de la mutation Bar de la drosophile se produit avec une fréquence relativement élevée. Le mécanisme de crossing over inégal imaginé par STURTEVANT (STURTEVANT 1925), pour l'expliquer est devenu classique.

La duplication observée cytologiquement (BRIDGES 1936, MULLER et coll. 1936) de la région 16.A, donne le phénotype mutant probablement par effet de position. On a montré qu'un crossing over oblique donne naissance à des génomes portant un ou trois éléments de la région 16.A.

Le crossing over peut se produire entre chromatides non sœurs mais aussi, quoique plus rarement, entre chromatides sœurs comme le démontre l'apparition de sauvages dans la descendance d'une femelle Bar/déficiencie (PETERSON et LAUGHAN 1963). Il est même probable que la perte d'un élément de la duplication peut se produire au niveau de chaque chromatide comme l'indique les expériences utilisant des drosophiles porteuses d'un chromosome X en anneau (GREEN 1968).

Le mécanisme proposé par STURTEVANT a été largement utilisé pour expliquer divers phénomènes. Certains sont en fait très semblables à Bar, telle la réversion du mutant white ivory de la Drosophile (BOWMAN 1965), ou même la perte des éléments B des complexes A^b du maïs (LAUGHAN 1955). Chez E. coli, (HILL et col. 1968), un supprimeur d'une mutation faux sens peut également être rencontré sous forme instable : les souches porteuses de la mutation supprimeur ségrégent des cellules tryptophanes moins non supprimées. L'instabilité serait due, ici, à l'élimination de l'un des éléments d'une duplication en tandem (su^- . su^+).

MAGNI (MAGNI 1964), s'intéresse aux réversions spontanées au cours de la méiose et démontre qu'elles sont liées à des échanges de marqueurs externes. Il en déduit que les mutations étudiées sont dues à des délétions ou à des insertions de bases et que les réversions durant la méiose sont la conséquence de crossing over inégaux de telle sorte que le cadre de lecture se retrouve en phase, de la façon imaginée par CRICK (CRICK et coll. 1961)

Le crossing over inégal est utilisé aussi pour expliquer des situations génétiques curieuses. Ainsi, la réversion à haute fréquence (magnification) du gène bobbed de la drosophile correspondrait à des gains de matériel génétiques dus à des crossing over inégaux, (RITOSSA 1968).

De même, la paramutation (voir plus loin) pourrait être due à des gains ou à des pertes de segments hétérochromatiques. Ces deux phénomènes ont donc reçu la même interprétation : il nous semble qu'elle reste à vérifier au niveau moléculaire.

Enfin le phénomène de "Selfing" (DEMEREK 1962) observé chez Neurospora (BAUSUM et WAGNER 1965), a lui aussi été interprété par le crossing over inégal : nous reviendrons sur cette interprétation de la fréquence élevée de sauvages (jusqu'à 40 %) issus d'un croisement homozygote mutant.

II - 3 - Les instabilités dues à des accidents chromosomiques.

Les ségrégations aberrantes que nous avons rencontrées peuvent faire penser à l'existence de remaniements chromosomiques dans les souches étudiées. Les remaniements peuvent conduire à des situations

génétiques non équilibrées, fortement instables.

Par exemple, chez *Aspergillus*, (NGA et ROPER 1969), des souches possédant un segment chromosomique dupliqué, dont l'un des éléments est rattaché à un groupe de liaison inhabituel, sont hautement instables. Les souches porteuses de la duplication ont une croissance réduite et une morphologie particulière. L'élimination de l'un ou l'autre des segments dupliqués donne des secteurs à croissance rapide.

D'autres cas dont la cause première est également une forte irradiation aux rayons X ont été décrits (PERKINS 1966, NEWMAYER et TAYLOR 1967 par exemple).

Des anomalies de la méiose conduisent également à des situations non équilibrées, comme c'est le cas des pseudo sauvages (pseudo wild types) étudiés chez divers organismes tels le *Neurospora* (MITCHELL, PITTINGER et MITCHELL 1952). A partir d'un croisement entre souches portant des gènes mutants liés, on sélectionne des individus sauvages, qui en fait sont disomiques, par suite d'une non-disjonction méiotique. Ces individus sont instables, et par perte de matériel génétique, donnent des secteurs génétiquement semblables à l'un ou l'autre des parents.

II - 4 - Les gènes à expression variable

Les accidents chromosomiques provoquent souvent un fonctionnement aléatoire des gènes transposés dans une région étrangère, d'où l'impression d'une grande instabilité. De nombreux gènes à expression variable ont été mis en évidence : la "variégation" a été rencontrée il y a près de cinquante ans chez le maïs (EMERSON 1922) et *Drosophila virilis* (DEMEREK 1926). Chez *Drosophila melanogaster*, on a montré que des mouches à yeux blancs avec quelques ommatidies rouges (white mottled) ont des chromosomes ayant subi des cassures (MULLER 1930), transposant le gène $white^+$ dans une région hétérochromatique (PANSKIN 1938). On montre que cet effet de position est réversible : de nouvelles cassures chromosomiques peuvent être produites et provoquer, en ne laissant plus le gène w^+ à proximité d'hétérochromatine, le retour au fonctionnement normal (PANSKIN 1938).

HSU (HSU 1962) a émis l'idée que les gènes soumis à variégation seraient partiellement inaptes à la transcription, par suite d'une condensation du chromosome due à la présence d'hétérochromatine.

II - 5 - Instabilités dues à des éléments transposables.

Différents cas de mutations à haute fréquence ont été mis en rapport avec des éléments de contrôle. (Mc CLINTOCK 1956). Comme dans le cas des effets de position, la nature même du gène affecté peut ne pas avoir changé bien que son expression soit modifiée.

Lorsque l'élément de contrôle est présent, le gène ne fonctionne pas normalement ; lorsque l'élément de contrôle a disparu, l'inhibition est levée.

Malgré de très grands efforts et des travaux très nombreux, la nature exacte des éléments de contrôle n'a pu être déterminée. Si la possibilité d'existence autonome n'a pas été démontrée, ils possèdent en commun avec les épisomes bactériens la possibilité d'exister en des sites bien déterminés du chromosome (NELSON 1968).

De nombreux cas d'éléments transposables provoquant des changements des gènes qui leur sont proches ont été décrits chez le maïs (pour revue voir PETERSON 1970). Ils peuvent exister sous plusieurs formes dont le temps d'action est variable au cours de l'ontogénèse (voir par exemple SCHWARTZ 1960).

Chez la drosophile le "gène" white crimson" est hautement mutable (GREEN 1967), le facteur déterminant la haute fréquence de mutation lui étant lié (GREEN 1969 a). De plus, il est transposable (GREEN 1969 b) : il possède donc certaines propriétés des éléments de contrôle.

Chez Salmonella, des gènes instables ont été étudiés et mis en rapport avec des "épisomes de contrôle" qui induiraient des mutations avec une grande fréquence (DAWSON et SMITH KEARY 1963).

Enfin plusieurs cas d'instabilité décrits chez les bactéries (AMES et al. 1963, GENOZA et PAINTER 1964 : CURTISS 1964), ont été mis en rapport avec de véritables épisomes. En particulier, une suppression de mutants lac⁻ de E. coli (SCHWARTZ 1965) est sous la dépendance d'un épisome : les souches supprimées stables correspondent à l'intégration de l'épisome, possible en deux sites du chromosome bactérien. Les souches instables possèderaient la même information mais sous forme autonome dont la replication ou la ségrégation pourraient ne pas être concomittante de celle de la cellule.

On voit donc qu'existent dans la littérature les intermédiaires entre le cas d'une information portée par un épisome, pouvant être ou non intégré, et le cas des éléments de contrôle pour lesquels on n'a pas démontré d'existence autonome, et dont l'action est plus ou moins indirecte.

II - 6 - Paramutation

La paramutation représente le cas extrême des instabilités génétiques puisqu'elle se produit avec une fréquence de 100 %.

Chez le maïs, un cas bien décrit est celui des "gènes" R^r et R^{st} . L'expression des différents allèles est observée chez des hétérozygotes avec r^g , qui à l'état homozygote ne produit pas d'anthocyane. La production de ce pigment est normale chez un hétérozygote R^r/r^g . Elle est réduite à quelques points de l'aleurone chez un hétérozygote R^{st}/r^g . Les gamètes mâles issus d'un hétérozygote F_1 $R^{st} R^r$ fécondant des ovules $r^g r^g$, on obtient des graines $R^{st} r^g r^g$ semblables à celles obtenues dans un croisement $R^{st} R^{st} \times r^g r^g$. Par contre, l'autre moitié des graines, supposées être $R^r r^g r^g$, ont une pigmentation réduite à de très rares points, alors que des graines de même constitution génétique, obtenues à partir d'un croisement $R^r R^r \times r^g r^g$, sont entièrement colorées.

Ce résultat est interprété par les auteurs en disant que l'expression des allèles R^r a été altérée par le passage dans l'hétérozygote $R^r R^{st}$: R^r est paramutable et R^{st} paramutagène.

Les hypothèses avancées pour rendre compte de ces observations sont très diverses. BRINCK lui même (BRINCK 1964), pense que l'activité de R^r est sous la dépendance de segments hétérochromatiques (métamères), R^r s'exprimant d'autant moins que le nombre de métamères présents est grand, R^{st} favorisant une surproduction de ces métamères régulateurs. Par contre, ALTENBURG (ALTENBURG 1959) suggère une interaction entre le gène et un virus pour tenter d'expliquer cette transformation.

Sans choisir entre ces deux types d'hypothèses, il nous semble suffisant de noter leur existence et leur dissemblance pour montrer que le domaine auquel elles s'adressent est extrêmement flou. Les modèles que l'on est tenté de faire n'ont finalement qu'une valeur relative lorsqu'on s'intéresse aux problèmes posés par les effets de position, les éléments de contrôle et la paramutation. Ils s'appliquent en effet, au moins partiellement, à cet élément de nature et de fonction mal définies qu'est l'hétérochromatine.

III - INTERPRETATION DES RESULTATS

III - INTERPRETATION DES RESULTATS

III - 1 - Exclusion d'hypothèses.

III - 2 - Essai d'interprétation des souches auxotrophes à forte (nic-2 F), ou faible et non agressive (nic-2 fn) réversion, et des souches prototrophes illégitimes.

2 - 1 - Nic-2 correspond à l'insertion d'un fragment d'ADN.

2 - 1 - 1 - Insertion d'un fragment à appariement intra-caténaire.

2 - 1 - 2 - Insertion d'un fragment encadré de séquences répétées.

2 - 2 - Nic-2 est une mutation ponctuelle, la réversion étant due à la présence d'une information sauvage non fonctionnelle.

2 - 2 - 1 - Hypothèse particulière.

2 - 2 - 2 - Hypothèse maître-esclaves.

2 - 3 - Conclusion et expériences à réaliser.

III - 3 - Les problèmes posés par nic-2 fa.

III - 4 - Généralisation de nos observations. Les problèmes qu'elles posent.

4 - 1 - Discussion du cas des mutants isoleucine valine chez Neurospora.

4 - 2 - Interprétation de supresseurs chez Coprinus lagopus.

4 - 3 - Les conséquences possibles des réversions à haute fréquence.

III - INTERPRETATION DES RESULTATS

III - 1 - Exclusion d'hypothèses

Parmi les cas d'instabilités que nous venons de décrire certains se manifestent en absence de reproduction sexuée ou parasexuée.

Ils correspondent souvent à des variations de l'expression des gènes par des effets de position ou sous l'effet d'éléments de contrôle. Manifestement, la réversion de nic-2 n'est pas directement comparable à ces phénomènes. L'absence de revertant en phase végétative, même diploïde, et la distribution non clonale des prototrophes dans les tétrades indique en effet que la réversion est méiotique.

La stabilité mitotique et surtout l'excellente germination observée dans de nombreuses séries de tétrades, de même que l'absence d'anomalies de ségrégations de gènes proches, fait qu'on ne peut rendre un accident chromosomique responsable de l'apparition de prototrophes.

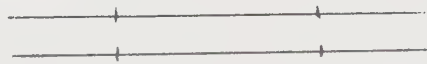
Un homozygote nic⁻/nic⁻ est hétérozygote pour d'autres marqueurs malgré les deux isogénisations réalisées. On peut tenter d'interpréter la réversion par la ségrégation à la méiose d'un système génétique complexe dont les éléments viennent des deux génomes parentaux, ce système génétique pouvant posséder un effet suppresseur ou mutateur.

Cette hypothèse est à rejeter puisque la réversion peut se produire en absence même de ségrégation dans les souches homothalliques.

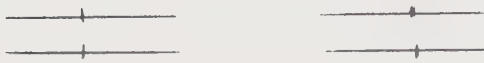
La nature méiotique de la réversion nous a conduit naturellement à rechercher un rapport avec la recombinaison qui peut parfois se produire avec une très haute fréquence, comme on l'a observé dans des cas de conversion génique. (EMERSON et YU-SUN 1967, ROSSIGNOL et LEBLOND comm. pers.) La réversion pourrait être expliquée par un appariement déplacé, soit au long d'un grand segment de chromosome, comme dans le cas de la duplication qu'est Bar, soit au niveau de quelques bases, au voisinage de séquences monotones (STREISINGER et col. 1966), ou répétées (OCADA et col. 1970 ; IMADA et col. 1970). L'erreur qui découle de cet appariement déplacé pourrait, par perte de matériel surnuméraire redonner une séquence fonctionnelle.

Que ce mécanisme se produise pour toute une région génétique ou seulement pour quelques bases, on devrait noter un lien net avec la recombinaison des marqueurs externes. Cela n'ayant pas été observé, ce type d'hypothèse est donc à rejeter, au moins sous une forme simple.

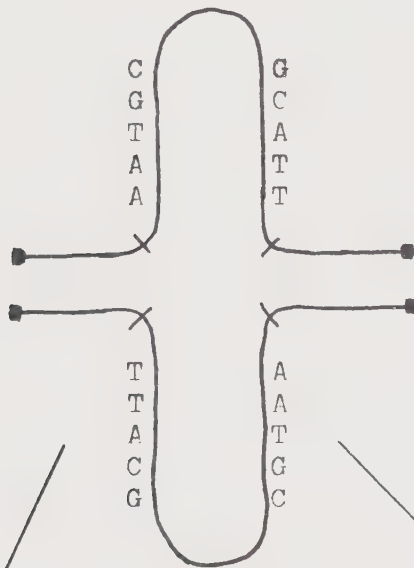
Appariement intracaténaire.



sauvage

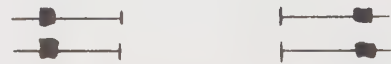


rupture



insertion :

nic-2 F

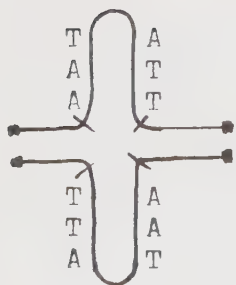


perte



recollement

(+)



perte d'une partie de
l'insertion :
nic-2 fn

Les interprétations que nous venons d'envisager sont valables pour des cas bien décrits et sont quasi classiques. Aucune ne possède les caractéristiques de la réversion de nic-2. Nous allons donc essayer de décrire quelques hypothèses pouvant rendre compte de nos résultats, au moins pour les formes nic-2 F, nic-2 fn et les revertants qui en sont issus.

III - 2 - Essais d'interprétation des souches auxotrophes à forte (nic-2 F) ou faible et non agressive (nic-2 fn) reversion, et des souches prototrophes illégitimes (+).

L'une des hypothèses que nous allons proposer fait intervenir un élément extérieur au chromosome (particule). Les autres supposent des interactions chromosomiques, soit intracaténaire, soit au niveau du duplex.

III - 2 - 1 Nic-2 correspond à l'insertion d'un fragment d'ADN.

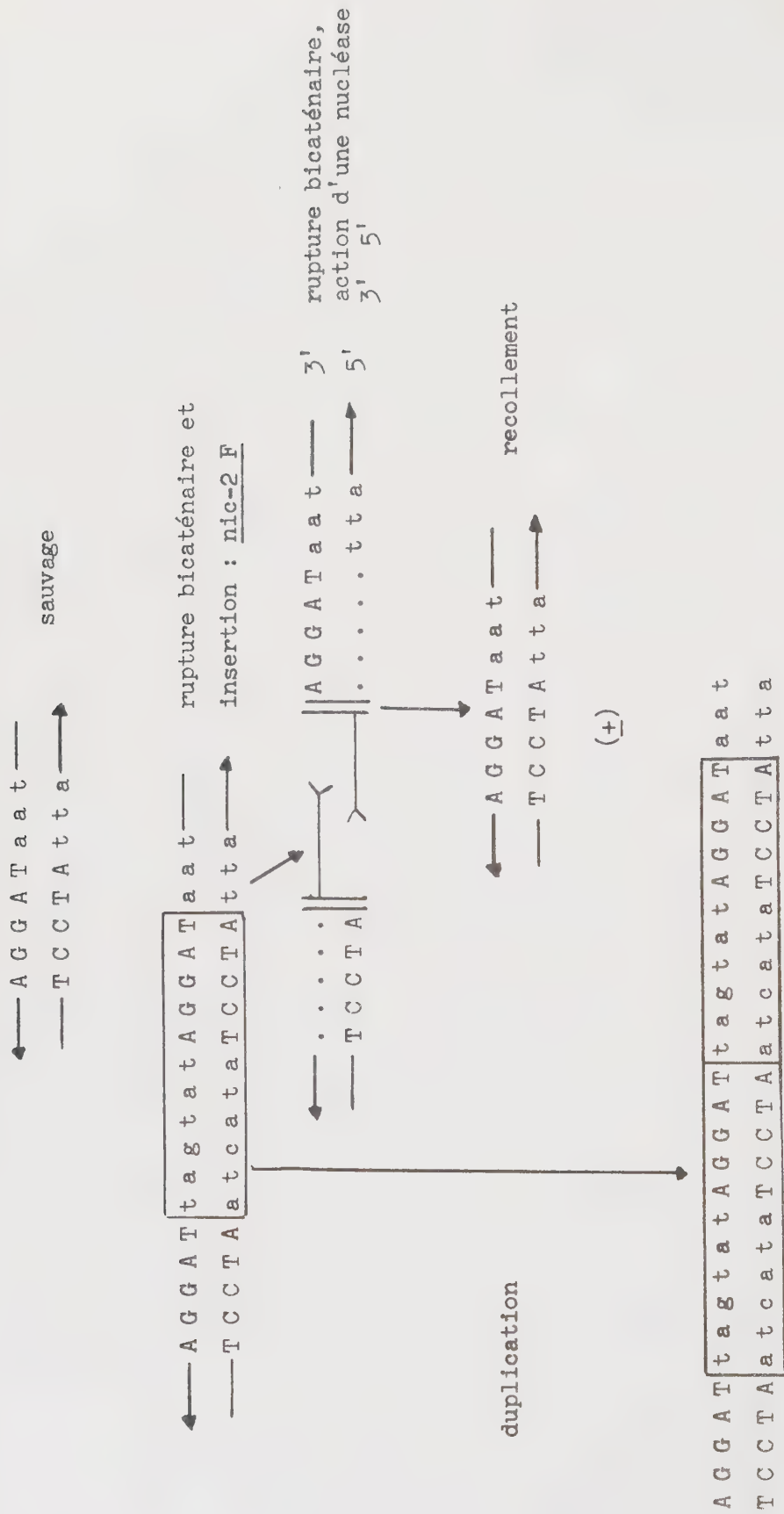
On a montré que des mutants polaires extrêmes d'*Escherichia coli* correspond à des insertions de 40 à 2100 nucléotides (JORDAN et col. SHAPIRO 1969). L'insertion de matériel étranger n'est pas rare puisque l'on a trouvé que ce type de mutants représentaient environ 15 % des mutations conduisant à une perte de la galactokinase (voir discussion SHAPIRO 1969).

Le matériel surnuméraire peut disparaître du génome. L'information reconstituée est normale, ce qui indique que le mécanisme de perte doit être très précis. Cette perte peut se produire chez des bactéries rec. (JORDAN et col. 1967). On peut donc admettre que tous les enzymes de la recombinaison ne sont pas nécessaires, fait qui est à rapprocher de l'absence de corrélation entre la réversion de nic-2 et la recombinaison de marqueurs externes.

La réversion de ces mutants est généralement proche de 10^{-7} . Il n'a pas été trouvé de souche particulièrement instable mais pour tant, un mutant gal⁻ pouvant être du même type (voir discussion JORDAN et col. 1968) donne des révertants instables (gal⁺ $\rightarrow$ gal⁻ avec une fréquence de 1.10^{-3}) (MORSE 1967).

Pour tenter d'expliquer la grande instabilité de nic-2, nous avons été amené à attribuer au fragment inséré des qualités lui permettant d'être éliminé avec une grande facilité. Nous avons à notre disposition deux possibilités : l'appariement intracaténaire et les séquences répétées.

Séquences répétées



nic-2 fn

III - 2. 1. 1. - Insertion d'un fragment à appariement intracaténaire

L'instabilité de certains mutants R II du phage T 4 (FOLSOME 1964) a été interprétée en tenant compte d'un modèle proposé pour expliquer des fréquences de recombinaison élevées, à proximité d'une mutation chez le phage P 22 (BENZIGER et HARTMAN 1962). Ce modèle admet la possibilité d'appariements intracaténaires (c'est possible dans une molécule d'acide nucléique (FRESCO et ALBERTS 1960).

Une rupture bicaténaire, sans perte de nucléotides, suivie d'insertion d'un segment pouvant s'apparier à l'intérieur d'un même brin est la version la plus simple d'un tel modèle expliquant la mutation nic-2. La réversion serait due à l'excision totale d'un tel appendice, $\underline{F} \longrightarrow \underline{fn}$ à une perte partielle, rendant l'appariement intracaténaire moins fréquent ou moins sujet à rupture.

Ce mécanisme donnerait des sauvages stables. Il est peu probable qu'une transformation $\underline{fn} \rightarrow \underline{F}$ soit possible. En revanche, on doit s'attendre à trouver des nic⁻ stables dans certains cas, à moins que les pertes envisagées soient d'une précision et d'un parallélisme exemplaire.

III - 2. 1. 2. - Insertion d'un fragment encadré de séquences répétées.

La longueur des molécules d'ADN rend possible l'existence de séquences identiques. Si elles sont suffisamment longues et rapprochées, elles peuvent être une source d'erreurs (THOMAS 1966).

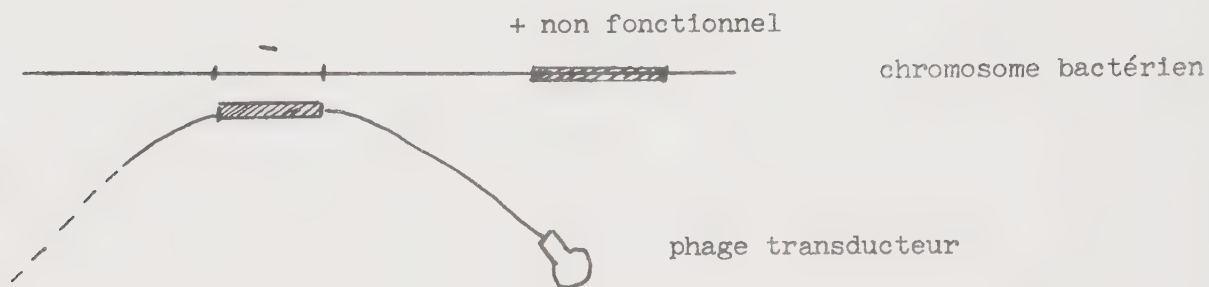
Imaginons que la mutation ,nic-2 est due à l'insertion d'un segment d'ADN se trouvant encadré par deux séquences identiques.

Il est possible que deux séquences identiques favorisent l'attaque de l'ADN, car de telles répétitions doivent être contre sélectionnées. Sinon on peut envisager que ces séquences soient spécifiquement reconnues par une endonucléase coupant les deux brins (KELLY et SMITH 1970).

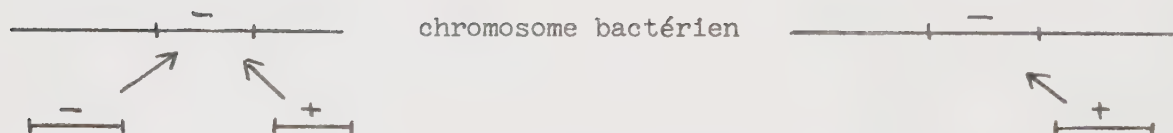
Le fragment étranger peut être éliminé et l'on obtient alors un génome parfaitement sauvage.

Le mécanisme invoqué ici pourrait rendre compte de la perte d'éléments dupliqués ou tripliqués chez la Drosophile (GREEN 1968). Cette perte peut se produire, rarement il est vrai , (10 sur 436,423 individus dans le cas de Bar) en absence de recombinaison de marqueurs externes, et ce avec la même fréquence pour des chromosomes normaux ou en anneau. Il s'agit donc d'un événement intéressant des chromatides-sœurs ou une seule chromatide et nous pensons que le mécanisme imaginé par THOMAS pourrait en être responsable.

Instabilité due à la
transduction chez Salmonella.



appariement illégitime



phages venant de bactéries
hôtes dont la mutation est
ponctuelle :

compétition

phages venant de bactéries
hôtes "délétion" :

pas de compétition

différence de fréquence de réversion

Plus les séquences répétées sont éloignées, moins leur reconnaissance est facile : ce serait rare dans le cas de Bar parce que tout un segment important sépare les deux séquences devant s'apparier. Ce serait commun chez nic-2 F parce qu'il y aurait peu de nucléotides entre elles, ce serait plus rare chez nic-2 fn, par exemple si l'on admet que le fragment peut parfois se dupliquer.

Dans cette hypothèse les sauvages illégitimes (+) seraient stables et l'on n'obtiendrait pas de nic stables. De plus, il serait possible que les fn redonnent des F.

III - 2. 2 - Nic-2 est une mutation ponctuelle, la réversion étant due à la présence d'une information sauvage non fonctionnelle.

Les transformations de nic-2 telles que nous venons d'imaginer qu'elles se produisent, correspondent à des modifications "sur place" sans qu'il soit besoin de faire appel à une région homologue du génome.

Un tel besoin se fait sentir lorsque l'on analyse le phénomène de "Selfing" chez Salmonella (DEMEREK 1962). Dans ce cas, des phages transducteurs ayant lysé une bactérie auxotrophe, provoquent une augmentation de la réversion de bactéries du même type.

L'idée d'attribuer au crossing over inégal la production d'individus bactériens prototrophes après transduction fut abandonné par l'auteur lorsqu'il montra que des Salmonelles sauvages pouvaient être obtenus à la suite d'une transduction par un phage venant d'une bactérie dont la région génétique correspondante manquait par suite d'une délétion. (DEMEREK 1963)

L'instabilité due à la transduction a été attribuée (CLARK 1964, GRELL 1970) à l'existence de régions homologues ou quasi homologues dans le génome bactérien. Le phage transducteur emporterait un fragment susceptible d'être ensuite intégré à la place de la portion de séquence mutante.

Le fait qu'un phage issu d'une bactérie porteuse d'une délétion donne parfois plus de révertants a été attribué (GRELL 1970) à une absence de compétition entre les 2 séquences.

Ces observations pourraient rendre compte de la réversion de nic-2, à condition qu'existe, chez un Eucaryote, un vecteur d'information sauvage non fonctionnelle, que l'on obtienne des appariements illégitimes et le remplacement de la séquence défectueuse par une séquence normale. Deux possibilités existent : nous allons tout d'abord nous intéresser à la possibilité d'existence d'une particule porteuse de l'information sauvage. Nous verrons ensuite si l'hypothèse des gènes maîtres et esclaves ne peut rendre compte de nos observations.

III - 2. 2. 1 - Hypothèse particulière

Nous n'avons pas mis en évidence d'hérédité cytoplasmique dans nos expériences. Néanmoins, il est possible d'imaginer que le phénomène étudié est dû à une particule. Elle aurait la caractéristique d'être nucléaire (tels les éléments de contrôle). La possibilité de se détacher du chromosome ou de se recombinaison existerait seulement à la méiose.

L'information sauvage portée par cette particule pourrait être intégrée dans le chromosome et remplacer la séquence déficiente. Les souches fn porteraient des particules ayant moins tendance à l'intégration.

Pour rendre compte de la réversion propre à chaque "allèle" dans un croisement fn x F, on est de plus conduit à attribuer aux particules une nature telle qu'existe une liaison étroite avec le chromosome.

Une telle liaison a été imaginée dans les études de drosophiles issues d'œufs traités par de l'ADN (FOX, YOON 1970). Les auteurs étudient en particulier une souche vermillon brown (v bw), dont les individus, incapables d'effectuer la synthèse des ptérines (bw) et des ommochromes (v) ont tous les yeux très peu teintés.

Des œufs "v bw" traités par de l'ADN "v⁺ bw⁺" donnent des mouches dont la descendance, parfois après plusieurs générations, est faite d'individus à yeux allant du phénotype parental (quasi blanc) à un phénotype proche de celui d'une souche brown (v⁺ bw) : les auteurs montrent que le changement de phénotype est lié au gène v alors que bw n'a pas été affecté.

A partir de mouches à yeux plus ou moins colorés des stocks ont été constitués. Certains, correspondant à des mouches à yeux fortement colorés, sont stables. D'autres, présentant une coloration plus faible, ont une variabilité plus grande : on peut trouver dans leur descendance des mouches à yeux semblables à ceux de la mouche "v bw" de départ.

Néanmoins la descendance de ces dernières comporte généralement des individus à yeux colorés. Seules de rares individus (1/1000) ne redonnent que des individus à yeux quasiment blancs (comme v. bw)

Ces diverses observations conduisent les auteurs à proposer un modèle "d'exosome". A la suite du traitement par l'ADN sauvage, l'information v⁺ viendrait se superposer au gène v sous forme d'une particule (ou exosome) étroitement liée au locus vermillon, sans qu'il y ait intégration comme dans le cas d'une véritable transformation.

L'exosome se répliquerait en même temps que le chromosome. La transcription de l'information portée par cette particule serait incertaine, bonne dans certaines lignées, moins bonne dans d'autres. Enfin, l'exosome pourrait être perdu (cas des lignées ne redonnant que des individus totalement mutants).

Ces expériences demandent confirmation, mais elles sont une indication qu'une liaison peut s'établir entre le chromosome et un élément étranger, porteur d'information. Ce modèle rendrait assez bien compte de nos observations, en imaginant que l'on peut trouver des "exosomes" à affinité plus ou moins grande pour la région nic-2. La stabilité des sauvages illégitimes devra être soigneusement vérifiée pour savoir, si des nic⁻ peuvent être ou non retrouvés, ce qui dans le cadre de cette hypothèse, indiquerait que la réversion est due à une association d'un nouveau type du chromosome et de la particule, et non à l'intégration de cette dernière.

Nous allons discuter maintenant le dernier des modèles que nous proposons ; il a le mérite de reposer sur des bases expérimentales solides.

III - 2. 2. 2 - Hypothèse maître-esclaves

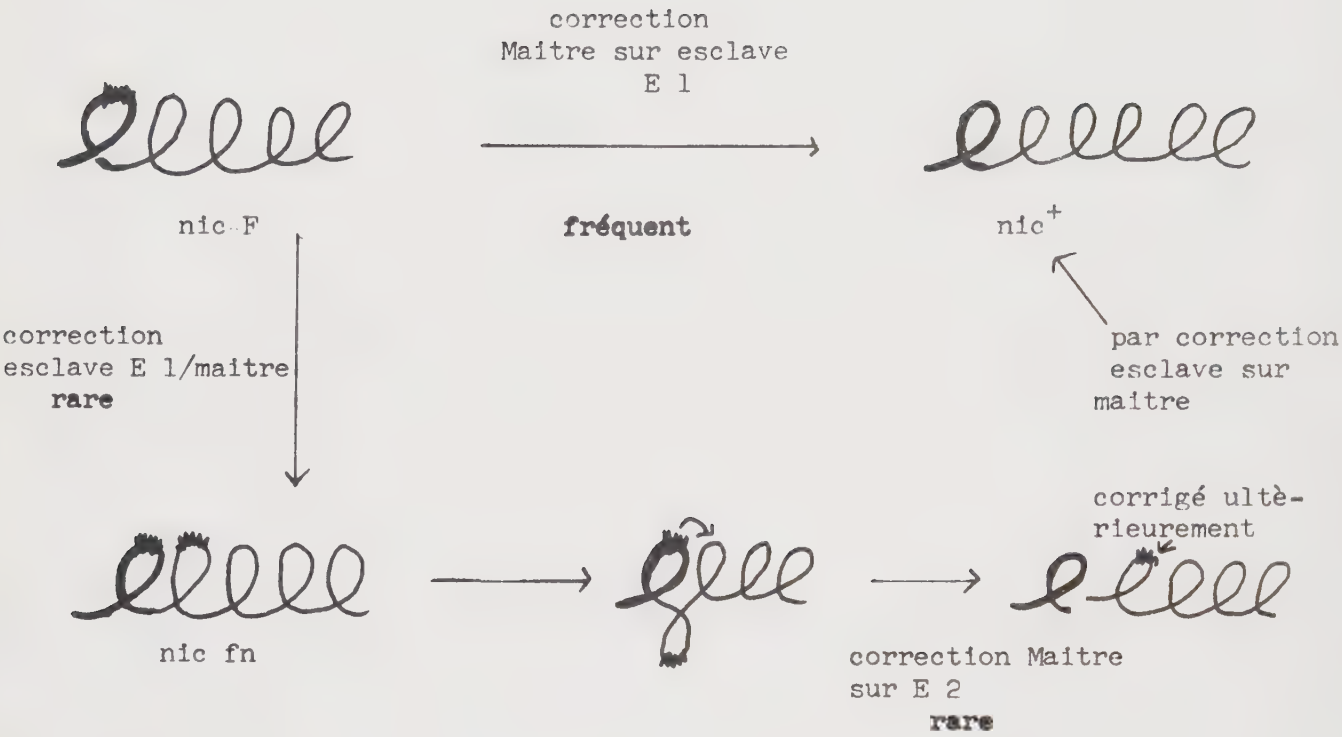
Une autre possibilité d'existence d'une information sauvage non fonctionnelle est qu'elle soit purement chromosomique. Elle peut être envisagée dans le cadre de l'hypothèse séduisante du maître et des esclaves (CALLAN 1967, WHITEHOUSE 1967). Cette hypothèse a été formulée pour tenter d'expliquer la nature des chromosomes en écouvillon et l'existence de redondances génétiques (RITOSSA, ATWOOD et SPIEGELMAN 1966, BROWN et WEBER 1968).

Elle suppose que l'unité capable de muter et de se recombinaison est un gène "maître". La production d'ADN messager est réservée à de nombreux gènes "esclaves", semblables au maître. Pour que maître et esclaves soient strictement identiques, on suppose (CALLAN 1967), qu'à chaque génération, une correction des esclaves sur le maître se produit.

Ainsi, si ce dernier est affecté par une mutation, tous les esclaves la porteront, après la correction. Soulignons que dans l'hypothèse de CALLAN et WHITEHOUSE, ce sont toujours les esclaves qui se corrigent sur le maître et non le contraire.

Ces esclaves se détacheraient du chromosome avant que le crossing over se produise, ce qui permettrait de comprendre (WHITEHOUSE 1967) comment les gènes peuvent être contigus et comment l'ADN hybride peut intéresser plus d'un gène (MURRAY 1969). Le détachement et le rattachement des esclaves (WHITEHOUSE 1967 et 1969) se ferait par un mécanisme voisin de celui invoqué pour le détachement d'un épisome du chromosome bactérien (CAMPBELL 1962)

Maitre-esclaves



Ce modèle peut fournir une explication à l'instabilité génétique (FINCHAM 1967) et nous avons essayé de l'adapter au cas de nic-2. Plusieurs possibilités, voisines les unes des autres, peuvent être prises en considération. Nous avons choisi d'admettre que la mutation du maître interdit, au moins en grande partie, la correction des esclaves et leur transcription (nic-2 aurait donc un maître muté et une série d'informations sauvages non fonctionnelles). De plus, comme FINCHAM, nous admettons que la mutation rend possible une correction dans le sens esclave-maître.

La correction des esclaves ne se faisant pas, ils peuvent avoir conservé une information sauvage, quoique non fonctionnelle. L'erreur de correction (esclave-maître) supposée pourrait expliquer l'apparition de sauvages parfaitement normaux.

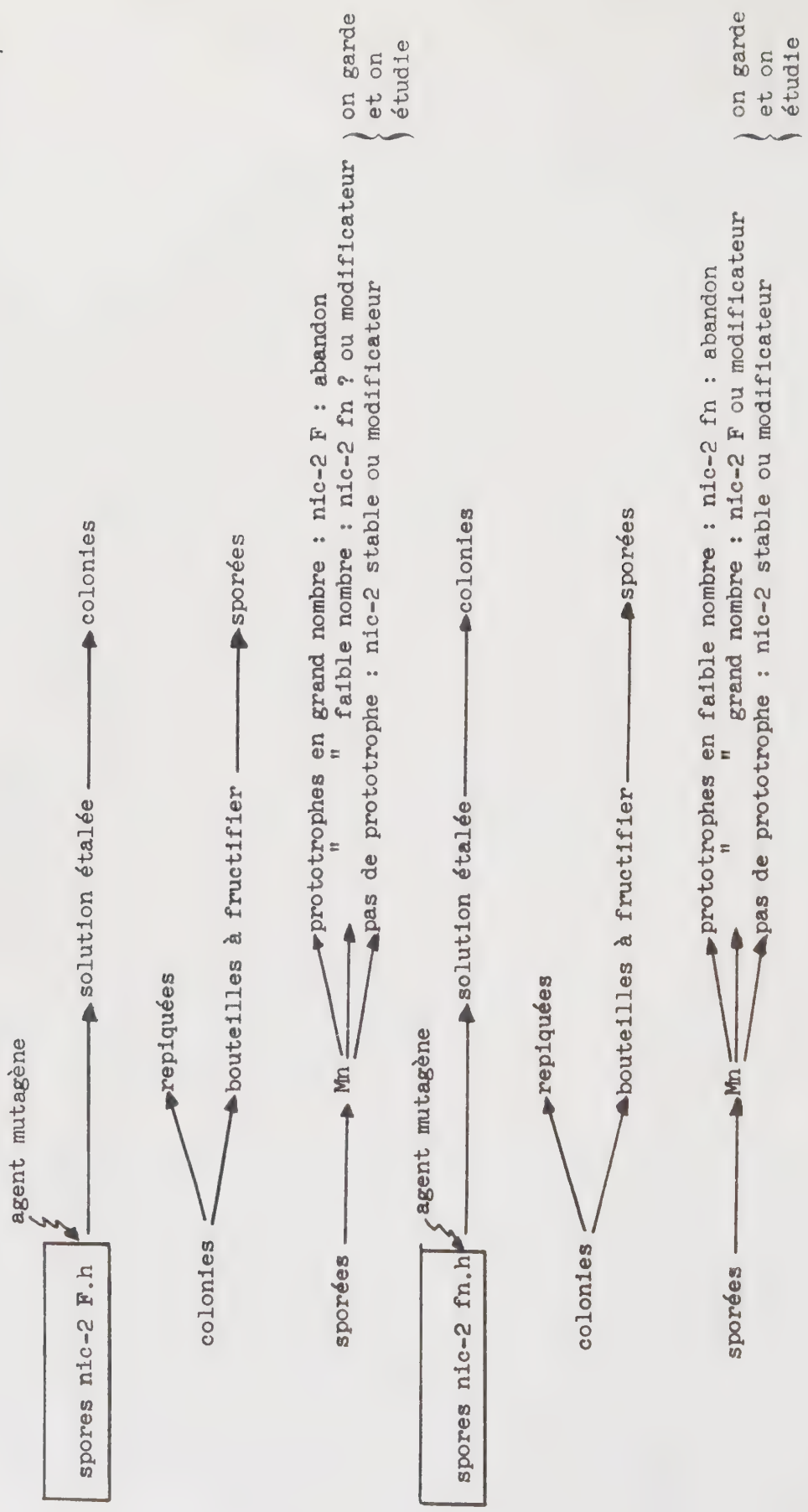
Si, parfois, la correction d'un ou plusieurs esclaves sur le maître peut se produire, on obtiendrait une séquence maître muté, esclave(s) muté(s), esclaves sauvages, et l'on peut admettre que la correction du maître sur les esclaves sauvages deviendrait plus rare. On aurait ainsi l'explication des fn.

On peut penser que ce dernier processus peut se reproduire, et que les fn pourraient donner naissance à des souches dont la réversion serait encore plus faible, jusqu'à ce que l'on obtienne des génomes entièrement mutants donc des souches nic⁻ stables.

III - 2. 3 - Conclusion et expériences à réaliser.

Les hypothèses que nous venons d'envisager rendent compte de l'auxotrophie de nic-2 et des transformations F et fn vers +, F vers fn.

Il nous semble difficile actuellement de faire un choix parmi elles, et il est même probable que d'autres hypothèses pourraient rendre compte de nos observations. En particulier, nous avons considéré que la mutation nic-2 affecte directement un gène de structure. Rien ne permet actuellement d'affirmer cela : on aurait donc pu discuter de la possibilité que la modification du génome sauvage se soit produite au niveau d'une région génétique régulant l'expression de la séquence déterminant directement une chaîne polypeptidique. En effet, ce type de possibilité existe expérimentalement, en particulier dans le cas des gènes gouvernant la synthèse des ARN ribosomiaux de la Drosophile (RITOSSA comm. pers.) et a déjà fait l'objet de modèles de régulation (voir par exemple BUTTEN et DAVIDSON 1969 ; QUETIER et GUILLE 1970).



Nous avons choisi de ne pas discuter ce type d'hypothèse pour ne pas alourdir encore notre exposé, et nous préférons attendre de nouveaux résultats expérimentaux pour choisir parmi les différentes possibilités théoriques.

Des expériences simples, consistant à préciser la stabilité des sauvages illégitimes, des nic-2 fn et à rechercher des souches à réversion nulle, sont à faire. Elles devront être réalisées sur un grand nombre d'individus pour être significatives.

De plus, nous envisageons de rechercher des mutations modifiant la réversion, soit en la diminuant soit en l'augmentant.

La recherche de ces mutations sera réalisée selon le schéma expérimental ci-contre. Au cours de cette recherche, on pourra étudier les transformations nic-2 F en nic-2 fn ou en nic-2 stables ; on pourra également voir si les transformations nic-2 fn vers nic-2 F ou nic-2 stables sont possibles. Ces expériences, permettant d'obtenir de nombreux renseignements seront réalisables assez facilement grâce aux souches homothalliques qui s'avèrent donc particulièrement précieuses pour notre travail.

Au lieu de rechercher ces mutations altérant le niveau de réversion, on peut également tenter de sélectionner des mutations influençant la recombinaison, les modèles envisagés faisant intervenir à un stade quelconque le métabolisme de l'ADN. De telles mutations n'ont pas actuellement été recherchées chez le Coprin, mais ont été dès à présent mis en évidence chez d'autres champignons (HOLLIDAY 1967, COX et HUNNABLE 1969).

On pourra, par exemple, tenter de sélectionner des mutations de sensibilité aux ultraviolets qui interfèrent avec la recombinaison.

De même l'effet de mutations affectant l'appariement serait intéressant à étudier : elles ne sont pas faciles à sélectionner. On pourra néanmoins étudier l'influence d'une mutation telle que adénine 3 (ad-3) de la levure. L'un des effets de cette mutation est une modification des fréquences de recombinaisons mitotiques (LUZZATI 1965) au niveau de plusieurs gènes (HENAUT et LUZZATI 1971), peut être en induisant des conditions para méiotiques en phase végétative (HENAUT comm. pers.). Quelque soit l'interprétation de ad-3, il sera intéressant de voir si la réversion méiotique de nic-2 est affectée par la présence d'une telle mutation. En première approximation, l'homologue de la mutation ad-3 de la levure existe chez le Coprin, d'après des données physiologiques.

Si, de plus, la présence de la mutation semblable à ad-3 pouvait conduire à obtenir des réversions en phase végétative, cela serait très intéressant pour l'étude de nic-2. En effet, de nombreuses expériences sur l'action d'agents physicochimiques, très difficiles sinon impossibles à réaliser chez le Coprin en cours de fructification, pourraient être alors envisagées. On pourrait également voir si la réversion se produit de façon semblable en phases haploïde, dicaryotique ou diploïde.

Nous pensons que la recherche de mutations affectant la réversion et (ou) la recombinaison, de même que celles faisant intervenir une mutation telle qu'ad-3 permettrait de mieux comprendre l'instabilité de nic-2. Le type de mutation que nous étudions pourrait alors devenir un outil d'étude de la méiose.

III - 3 - Les problèmes posés par fa.

L'existence et les propriétés (effet trans sur F, transformation méiotique en une forme -fn- sans effet trans) sont peut être les manifestations les plus curieuses du phénomène étudié. Elles sont en tous cas les plus difficiles à interpréter, aucun des modèles présentés plus haut ne permettant à notre avis d'en rendre compte.

Un effort devra être fait pour préciser à fond les caractéristiques des fa, en particulier à propos de la symétrie de la réversion dans des croisements nic-2 fa x ad⁻ nic-2 F, et de la possibilité d'existence de plusieurs niveaux d'agressivité. Il est difficile de prévoir ce que ces expériences pourront apporter à la compréhension de notre problème.

D'autres expériences devraient par contre donner des résultats importants et relativement prévisibles. Tout d'abord, nous nous proposons d'essayer de savoir si la transformation F → fa se fait à la mitose. L'indication que ceci est possible réside dans les dicaryons nic-2 F x nic-2 F donnant accidentellement de faibles réversions et qui serait en partie composé d'articles (F, fa). Si cela est vrai, on doit pouvoir par mixage ou prélèvement de poils de carpophores de tels dicaryons récupérer des génomes fa et démontrer aussi la transformation F → fa en phase végétative.

On peut imaginer que la transformation F → fn passe obligatoirement par le stade fa. Dans ce cas, les souches fa seraient incomplètement transformées, et ne deviendraient fn qu'en présence d'un enzyme présent seulement à la méiose. On peut espérer que l'on pourra soit par action d'agents physicochimiques, soit grâce à des mutations telles qu'ad-3, obtenir la transformation fa → fn en phase végétative.

A nouveau cela devrait permettre de mieux comprendre ce que représentent les souches fa.

Enfin nous nous proposons d'étudier la réversion dans des fructifications triploïdes (à partir d'un dicaryon obtenu par confrontation d'une souche diploïde et d'une souche haploïde). En utilisant des souches génétiquement marquées, il doit être possible de savoir si l'appariement est nécessaire à la réversion ; d'autre part l'étude d'un triploïde F.F. fa permettra de savoir si l'action trans de fa se fait ou non via l'appariement ce qui est un paramètre important à connaître.

III - 4 - Généralisation de nos observations. Les problèmes qu'elles posent.

Il serait important de trouver d'autres mutants à forte réversion ne serait-ce que pour savoir si le phénomène mis en évidence est généralisable. L'utilisation des souches homothalliques se révèle encore fructueuse pour cette recherche : il suffit de sélectionner des mutants biochimiques d'une telle souche, et de récolter les sporées que l'on peut obtenir, sans autre manipulation. Un étalement de ces sporées permettra rapidement de repérer des mutants qui donnent des prototrophes à la méiose.

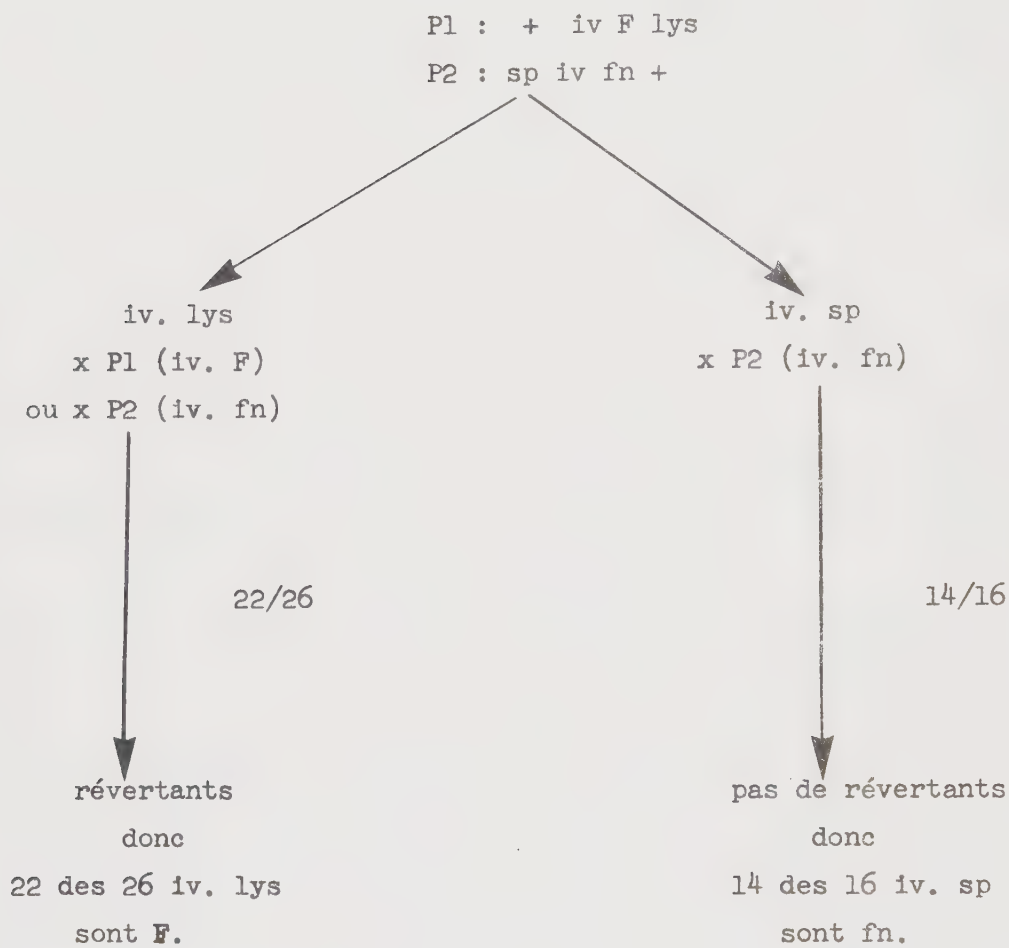
Cette sélection "au hasard" sera à coup sûr, plus rentable que la recherche systématique de mutants du locus nic-2. Trouver des allèles de nic-2 serait intéressant, par exemple pour savoir si la réversion est une propriété de l'ensemble des mutations détectées à ce locus : malheureusement les difficultés propres au Coprin rendent la sélection difficile, et c'est pour cela qu'il nous semble plus raisonnable de nous tourner délibérément vers la recherche de mutants à forte réversion, quelque soit leur localisation dans le génome.

Dès avant ces expériences que nous nous proposons de réaliser, des exemples de situations génétiques pouvant être interprétées en terme de haute fréquence de mutation, existent dans la littérature. Nous allons en discuter trois d'entre elles.

III - 4. 1 - Discussion du cas des mutants isoleucine-valine de Neurospora.

Des mutations affectant la biosynthèse de l'isoleucine et de la valine ont été localisées sur le chromosome V de Neurospora à peu près à mi-distance de deux marqueurs (lys⁻ et sp) situés à 26 U.R. l'un de l'autre. L'un des mutants (iv 318) donne des prototrophes à partir d'un croisement homozygote (WAGNER et BAUSUM 1965) bien qu'il soit parfaitement stable en phase végétative.

Interprétation des croisements entre souches iv.



Le croisement iv 318 sp x iv 318 lys donne 1,35 % de iv⁺. Vingt six spores iv lys et 16 spores iv sp ont été croisées avec les souches parentales. Les croisements des spores iv lys donnent généralement (22 sur 26) des révertants. Au contraire, les croisements des spores iv sp avec le parent identique n'en donnent que rarement (2 sur 16). Dans notre interprétation des faits, le parent lys pourrait être F et le parent sp fn (les auteurs emploient la nomenclature "efficient" et "inefficient").

Il est plus difficile de savoir si les croisements lys iv F sp⁺
lys iv fn sp présentent une assymétrie comme celle que nous avons relevé dans le cas homologue. La germination des divers génotypes en présence est en effet hétérogène.

Néanmoins, si l'on ne s'intéresse qu'aux deux génotypes parentaux on trouve une réversion moyenne de 0.11 pour les 125 individus lys sp⁺ (donc F) et une réversion moyenne de 0,055 pour les 221 individus lys⁺sp (donc fn). Il est difficile d'aller plus loin dans l'interprétation des sept croisements pouvant être F x Fn, mais en tous cas, rien ne s'oppose à notre interprétation.

Les auteurs ont relevé une légère corrélation entre la fréquence de la réversion et la recombinaison des marqueurs externes. D'autre part, l'analyse de 24 tétrades du croisement homozygote mutant et de tétrades faisant intervenir iv 318 et d'autres mutants isleucine valine, montre que le génotype lys sp est très fréquent chez les recombinants. Il est donc possible que le cas étudié ici ne soit pas strictement identique à celui que nous décrivons, mais nous pensons qu'il doit s'en rapprocher néanmoins beaucoup.

III - 4. 2 - Interprétation de supresseurs chez Coprinus lagopus

Chez les champignons, les cartes génétiques sont souvent construites à partir de données obtenues en tétrades. Cependant, il est parfois difficile de le faire. Une estimation de la liaison entre deux gènes est alors donnée en étudiant les spores repiquées une à une.

Dans un croisement entre une souche mutante supprimée et la souche sauvage de référence, on s'attend à trouver 25 % d'auxotrophes si les deux mutations sont indépendantes. Une quantité inférieure peut être expliquée par une liaison entre les deux gènes. C'est ainsi que LEWIS (LEWIS D. 1961) interprète les résultats qu'il obtient : méthionine 1 (met-1) et deux de ses supresseurs (su-1 et su-2) seraient liés (28 UR) le troisième étant indépendant.

Les diploïdes met-1 su-1 / met-1 su-2 (par exemple) poussant sur milieu minimum, il déclare que deux gènes non allèles ne complémentent pas. Cette conclusion étant étonnante, il nous semble qu'il aurait été nécessaire d'effectuer une localisation précise des mutations

Interprétation des résultats de D. LEWIS.

Interprétation de l'auteur

met-1 su-1

 + +



met-1 su-1

 + +

 + su-1

} prototrophes

met-1 + auxotrophes,

au nombre de 1 % :

met-1 et su-1 sont

distants de 2 UR

met-1 su-2

 + +



met-1 su-2

 + +

 + su-2

} prototrophes

met-1 su-2 auxotrophes,

au nombre de 14 % :

met-1 et su-1 sont

distants de 28 UR

Interprétation possible

met-1 su-2 met-1 su-1

 + + + +

tous deux à 2 UR
de met-1 mais su-1
est stable, tandis
que su-2 → +
avec une fréquence
élevée.

met-1 su-2

 + +



1 % auxo.

par recombinaison

13 % auxo.

par réversion

(met-1 su-2 →

→ met-1 +)

et de vérifier si un homozygote met-1 su/met-1 su ne donne pas d'auxotrophe, ce qu'il ferait si un gène suppresseur n'est pas stable. A la lumière de nos observations, cette vérification est très importante, la fréquence des auxotrophes pouvant ne pas correspondre à une fréquence de recombinaison mais plutôt à une fréquence de réversion.

Les résultats obtenus sont trop fragmentaires pour que l'on puisse savoir si l'hypothèse de non complémentation entre gènes non allèles est ou non valable, mais son étrangeté même nous conduit à penser qu'une analyse plus poussée pourrait ne pas la confirmer.

Une situation du même type mais mieux décrite (MORGAN 1966) concerne une mutation qui donne un phénotype "pourpre" (purple -pur-). Les croisements à la souche sauvage indique une ségrégation 1/1 (en spores). Des secteurs "blancs" apparaissent spontanément en cours de multiplication végétative : 50 d'entre eux ont été étudiés. Les croisements avec la souche sauvage donnent naissance à une quantité variable d'individus pourpres, indiquant qu'il s'agit de suppresseurs. Deux groupes fonctionnels existent.

Vingt trois des croisements de pur su du groupe A donnent des colonies "pur" avec une fréquence allant de 2 à 19 %.

Plutôt que d'envisager une absence de complémentation entre gènes non allèles l'auteur envisage la possibilité qu'un élément de contrôle puisse s'insérer à différents endroits du chromosome et provoquer la suppression de purple par un effet de position ou alternativement, qu'un seul gène puisse avoir des fréquences de mutations très différentes : "les gènes affectés par l'effet de position (LEWIS E. B. 1950) ou contrôlés par les éléments transposables du maïs, (Mc CLINTOCK 1956) montrent fréquemment une mutabilité élevée, comme le fait également les gènes sujet à la paramutation (BRINCK 1960). Si le mécanisme provoquant la ségrégation des purples dans les croisements des purples supprimés par la souche sauvage est la mutation plutôt que la recombinaison, alors les différents allèles du suppresseur pourrait soit avoir eux mêmes une haute et spécifique fréquence de mutation, soit avoir des activités mutagènes spécifiques, agissant sur quelque autre gène pour restaurer la pigmentation (MORGAN 1966).

L'auteur se demande donc si les mutations qu'il étudie n'ont pas une possibilité élevée de mutation réverse : nous pensons qu'il serait intéressant de connaître l'analyse en tétrades d'un croisement pur su (les homozygotes ne fructifient malheureusement pas). Il est
+ +

probable à notre avis qu'un croisement ségrégeant beaucoup de purples, montrerait que le suppresseur ne ségrège pas 2/2. Avec 20 % de purples, des tétrades a deux (pur) devraient être faciles à trouver. Si le suppresseur ségrège 2/2 les tétrades seraient à 2 pur su⁺ et 2 pur su et le croisement de ces dernières avec pur su donnerait une ségrégation 2/2. Par contre, dans l'hypothèse de la réversion à haute fréquence, certaines des tétrades à 2 pur seraient en fait 2 pur su⁺ et

2 pur⁺ su⁺ : le croisement des secondes avec pur su ne donnerait pas de ségrégation 2/2 pour pur.

III - 4. 3 - Les conséquences possibles de réversions à haute fréquence.

L'établissement d'une carte génétique demande l'étude de nombreux croisements, qui se recoupant les uns les autres ne peuvent prêter à la critique et conduisent à une situation linéaire et univoque.

Lorsque l'étude n'est que partielle et faite sur des individus ne faisant pas partie de tétrades, des erreurs de localisation, conduisant à des conclusions étonnantes sont possibles.

Seule l'étude de nombreuses souches a permis à MORGAN de se poser la question de la stabilité des mutations qu'il étudiait, en absence d'une localisation précise et de l'observation d'homozygotes mutants. Par contre, les expériences moins détaillées décrivant des supprimeurs de méthionine 1 apparemment non allèles par le test de recombinaison et ne complémentant pas , laisse cette question en suspens.

RESUME ET CONCLUSIONS

Le travail que nous venons de présenter a permis d'apporter quelques précisions sur la biosynthèse de l'acide nicotinique, en particulier sur la possibilité d'un passage direct de l'anthranilate en hydroxyanthranilate.

Sa partie la plus importante a mis en évidence l'instabilité du mutant nic-2 : avec une fréquence de 0,23, nic-2 réverse à la méiose, en donnant des individus sauvages, que rien jusqu'à présent ne permet de distinguer de la souche de référence. Cette forme nic-2 F n'est pas la seule que nous ayons rencontrée, puisque nous avons observé sa transformation, à un moment qui reste à préciser, en nic-2 fn et nic-2 fa. Grâce à la présence d'un marqueur proche on a pu montrer que les deux formes nic-2 fn et nic-2 F réversent pour leur propre compte, avec des fréquences différentes (0,02 pour nic-2 fn dans un hétérozygote). Par contre, la forme nic-2 fa a un effet trans sur les deux autres, tout dicaryon comportant au moins un génome nic-2 fa ayant une réversion variable, mais toujours inférieure à la fréquence de réversion de nic-2 F ou nic-2 fn, suivant le croisement réalisé.

Si nous n'avons pas pu préciser le temps et le mode d'apparition des souches nic-2 fa, nous avons mis en évidence une transformation fa en fn à la méiose.

Nous avons donc décrit plusieurs caractéristiques d'un mutant instable bien que, en particulier, le caractère d'auxotrophie soit parfaitement stable en phase végétative.

Le développement futur des expériences présentées ici devrait permettre de généraliser la notion de haute fréquence de réversion maiotique, ce phénomène pouvant être moins rare qu'il ne paraît tout d'abord. Nous avons en effet vu que certains résultats curieux pouvaient s'interpréter en ces termes et il est possible que des phénomènes du même genre aient été passés sous silence : les " mauvais gènes " sont rarement étudiés.

Les modèles que nous avons proposés sont surtout le support d'expériences nouvelles : nous espérons qu'elles permettront de trouver une explication plus que formelle à l'étonnante situation génétique que nous venons de présenter.

BIBLIOGRAPHIE.

BIBLIOGRAPHIE

- ALTENBURG E. 1959 - Virus versus gene change in maize.
Science 130, 220.
- AMES B.N., HARTMAN P.E., JACOB F. 1963
- Chromosomal alterations affecting the regulation
of histidine biosynthèse enzymes in Salmonella.
J. Mole. Biol. 7 23-42.
- ATWOOD K.C. - Communication personnelle.
- BAUSUM H. T., WAGNER R.P. 1965 - "Selfing" and other form of aberrant recombination in isoleucine-valine mutants of Neurospora.
Genetics 51, 815-830.
- BEALE G.H. 1965 - Genes and cytoplasmic particules. dans "Paramecium in cellular control mechanisms and cancer".
Emmelot P. et Muhlbock O. éditeurs.
Elsevier, Amsterdam, pp. 8-18.
- BENZER S. 1961 - On the topography of the genetic fine structure.
Proc. Nat. Acad. Sc. U.S.A. 47, 403-415.
- BOWMAN J.T. Jr. 1965 - Spontaneous reversion of the white ivory mutant of drosophila melanogaster.
Genetics 52, 1069-1079.
- BRIDGES C.B. 1936 - The bar "gene" a duplication.
Science 83, 210-211.
- BRINCK R.A. 1956 - A genetic change associated with the R locus in maize which is directed and potentially reversible.
Genetics 41, 872-889.
- 1960 - Paramutation and chromosome organisation.
Quart. Rev. Biol. 35, 120-137.

- BRINCK R.A., STYLES E.D., AXTELL J.B. 1968 - Paramutation : directed genetic change.
Science 159, 161-170.
- BRITTEN R.J., DAVIDSON E.H. 1969 - gene regulation for higher cells : a theory.
Science 165, 349-357.
- CALLAN H.G. 1963 - The nature of lampbrush chromosomes.
Int. Rev. Cytol. 15 1-34.
- 1967 - On the organisation of genetic units in chromosomes.
J. Cell Sc. 2, 1-7.
- CAMPBELL A.M. 1962 - Episomes
Advan. Genet. 11, 101-145.
- CLARK A.J. 1964 - Recurrent nucleotide sequences as explanation of the selfing phenomenon in Salmonella Tryphimurium.
Z. Vererbungslehre 95, 368-373.
- COEN D., DEUTSCH J., NETTER P., PETROCHILLO E. and SLONIMSKI P.P. 1969
- Mitochondrial genetics. dans "The development and inter relations of cell organelles".
Londres, 1969.
- CORRENS C. 1902 - Vber bastardierungsversuche mit Mirabilis-Sippen.
Ber. Deut. Botan. Ges. 20, 594-608.
- COX B.S., HUNNABLE E.G. 1969 - Recombination and repair in Yeast. dans "Euratom course in molecular biology."
Saclay - Lunteren 9-30, Septembre 1969.
- COX E.C., YANOFSKY C. 1969 - Mutator studies in E. coli.
J. Bact. 100, 390-397.
- CRICK F.H.C., BARNETT L., BRENNER S., WATTS TOBIN J. 1961
- General nature of the genetic code for protein.
Nature 192, 1227-1232.

- CURTISS R. 1964 - An E. coli K.12 HFR strain with the futility factor attached to or within the structural gene for β galactosidase.
Bact. Proceed. P. 30.
- DAWSON G.W.P., SMITH KEARY P.F. 1963 - Episomic control of mutation in *Salmonella typhimurium*.
Heredity 18, 1-20.
- DEMEREK M. 1926 - Reddish - a frequently "mutating" character in *D. virilis*.
Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 12, 11-16.
- 1962 - "Selfers" attributed to unequal crossing over in *Salmonella*.
Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 48, 1696-1704.
- 1963 - Selfer mutants of *Salmonella typhimurium*.
Genetics 48, 1519-1531.
- EMERSON M. 1922 - The nature of bud variations as indicated by their mode of inheritance.
Am. Naturalist 56, 64-79.
- EMERSON S. et YU-SUN C.C.C. 1967 - Gene conversion in the pasadena strain of *Ascobolus immersus*.
Genetics 55, 39-47.
- FINCHAM J.R.S. 1967 - mutable genes in the light of callan's hypothesis of serially repeated gene copies.
Nature 215, 864-866.
- FOLSOME C.E. 1964 - Unstable rII mutants of bacteriophage T4.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 14, 156-160.
- FOX A.S., YOON S.B. 1970 - DNA induced transformation in *Drosophila* : locus specificity and the establishment of transformed stocks.
Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 67, 1608-1615.

- FRESCO J.R., ALBERTS B.M. 1960 - The accomodation of non complementary bases in helical polyribonucleotides and deoxyribonucleic acids.
Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 46, 311-321.
- GINOZA H.S., PAINTER R.B. 1964 -Genetic recombination between the resistance transfer factor and the chromosome of E. coli.
J. Bact. 87, 1339-1345.
- GREEN M.M. 1967 - The genetics of a mutable gene at the white locus of D. melanogaster.
Genetics 56, 467-482.
- 1968 - Some genetic properties of intrachromosomal recombination.
Molec. Gen. Genetics 103, 209-217.
- 1969 a - Mapping a drosophila melanogaster "controlling element" by interallelic crossing over.
Genetics 61, 423-428.
- 1969 b - Controlling element induced transpositions of the white gene in D. melanogaster.
- HENAUT A. - Communication personnelle.
- , LUZZATI M. 1971 - Controle biochimique de la recombinaison chez Saccharomyces cerevisiae. II. Inhibition par la L histidine de la recombinaison intragénique mitotique à deux loci non liés.
Molec. Gen. Genetics (sous presse).
- HILL C.W., FOULDS J., SOLL L., BERG P. 1969
- Instability of missence suppressor resulting from a duplication of genetic material.
J. Mol. Biol. 39, 563-581.
- HOLLIDAY R. 1967 - Altered recombination frequencies in radiation sensitive strains of Ustilago.
Mut. Res. 4, 275-288.

- HULTER R., De MOSS J.A. 1967 - Organisation of the tryptophan pathway : a phylagenetic study of the fungi.
J. Bact. 94, 1896-1907.
- HSU TC, SCHMID W., STUBBLEFIELD 1964 - DNA replications sequences in higher animals. dans "The role of chromosomes in development". LOCKE M. ed.
Acad. Press N.Y.
- IMADA M., INOUE M., EDA M., TSUGITA A., 1970
- Frameshift mutation in the lysozyme gene of bacteriophage T 4 : demonstration of the insertion of four bases and the preferential occurrence of base addition in Acridine mutagenesis
J. Molec. Biol. 54, 199-217.
- JOURDAN E., SAEDLER H., STARLINGER P. 1967 - Strong mutations in the transfrase gene of the galactose operon in E. coli.
Molec. Gen. Genetics 100, 296-306.
- idem 1968 - 0° and strong polar mutations in the gal operon are insertions.
- KELLY T.J., SMITH H.O. 1970 - A restrution enzyme from Hemophiley influenzed II. base sequence of the recognition site
J. molec. biol. 51, 393/409.
- LAUGHAN J.R. 1955 - Structural and functional bases for the action of the A alleles in maize.
Am. naturalist 89, 91/106.
- LEWIS D. 1961 - Genetic analysis of methionine suppressor in Coprinus.
Genet. res. 2, 141/155.
- LEWIS E.B. 1950 - The phenomenor of position effect.
Adv. Genet. 3, 73/115.

- L'HERITIER P. 1958 - The hereditary virus of *Drosophila*.
Adv. in virus res. 5, 195/245.
- LUZZATI M. 1965 - Inhibition spécifique de la recombinaison intranukleaire.
Thèse Fac. Sc. Orsay.
- Mc LINTOCK B. 1956 - Controlling elements and the gene.
Cold Spring Harbor Symp. quant. biol. 21, 197/216
- MAGNI G.E. 1964 - Origin of spontaneous mutations in meiotic organisms.
J. Cell Comp. Physiol. suppl. 1 165/172.
- MASSON M. - Communication personnelle.
- MITCHELL M.B., PITTENGER T.H., MITCHELL H.K. 1952
- Pseudo-wild in *Neurospora crassa*.
Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 38, 569/580.
- MIYAKE T. 1959 - Mutator factor in *Salmonella typhimurium*.
Genetics 45, 11-14.
- MORSE M.L 1967 - Reversion instability of an extreme polar mutant
of the galactose operon.
Genetics 56, 331-340.
- MORGAN D.H 1966 - Suppression of purple in *Coprinus lagopus*-
an anomalous genetic situation
Genet. Res. 7, 195/206.
- MULLER H.J. 1930 - Types of visible variations induced by X rays in
Drosophila.
J. Genet. 22, 299-334.
- MULLER H.J., PROKOFYEVA-BELGOVSKAYA A.A, KOSSIKOV K.V. 1936
- The optical dissociation of *Drosophila* chromomeres
by means of U.V. light.
C.R. Acad. Sci. URSS 1, 234-242.

- MURRAY N.E. 1969 - The extent of recombination events within adjacent genes of *Neurospora* (abstract) dans "Euratom course in molecular radiobiology" SACLAY-FRANCON 9-30 sept. 1969.
- NELSON N.E. 1968 - The waxy locus in maize. V the location of the controlling elements alleles. *Genetics* 60, 507/524.
- NEWMAYER D., TAYLOR C.W. 1967 - A pericentric inversion in *Neurospora*, with unstable duplication progeny. *Genetics* 56, 771/791
- NGA B.H., ROPER J.A. 1969 - A system generating spontaneous intrachromosomal changes at mitosis in *Aspergillus nidulans*. *Genet. res.* 14, 67/70.
- OCADA Y., AMAGASE S., TSUGITA A., 1970 - Frameshift mutation in the lysozyme gene of bacteriophage T 4 : demonstration of the insertion of gene bases, and a summary of in vivo codons and lysozyme activities. *J. Mol. Biol.* 54, 219-246.
- PANSHIN I.B. 1938 - The cytogenetic nature of the position effect of the genes white (mottled) and cubitus interruptus. *Biol. Zh.* 7, 837/868.
- PERKINS D.D. 1966 - An insertional translocation in *Neurospora* that generates duplications heterozygous for mating type (abstract). *Genetics* 54, 354.
- PETERSON P.A. 1970 - Controlling elements and mutable loci in maize : their relationship to bacterial episomes. *Genetica* 41, 33/56.
- PETERSON H.M., LAUGHMAN J.R. 1963
- Intrachromosomal exchange at the bar locus in *Drosophila*.
Genetics 50, 126-133.

- QUETHE F., GUILLÉ E. 1970 - Modèle de régulation quantitative de l'information génétique.
C.R. Acad. Sc. Paris t.270, 1518-1522.
- ROSSA F.M., ATWOOD K.C., SPIEGELMAN S. 1966
- Molecular explanation of the bobbed mutants of drosophila as partial deficiencies of "ribosomal" DNA.
Genetics 54, 819-834.
- RITOSSA F.M. 1968 - Unstable redundancy of genes for ribosomal DNA.
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 60, 509-516.
- 1971 - DNA circularisation : a molecular approach for the detection and isolation of tandemly duplicated genes.
Nature 229, 84-86.
- ROSSIGNOL J.L., LEBLON G. - Communication personnelle.
- SAGER R. 1965 - Non-chromosomal genes in chlamydomonas. dans "Genetics to-day".
Proc. XIth intern. Congress Genet. GUERTS S.J. éditeur Pergamon, oxford 579-588.
- SCHWARTZ D. 1960 - Analysis of a highly mutable gene in maize. A molecular model for gene instability
Genetics 45, 1141-1152.
- SHAPIRO J.A. 1969 - Mutations caused by the insertion of genetic material into the galactose operon of Escherichia coli.
J. Mol. Biol. 40, 93-105.
- SIEGEL E.C., BRYSON E.C. 1967 - Mutator gene of E. coli B-1.
J. Bact. 94, 38-47.
- STREISINGER G., OKADA Y., EMRICH J., NEWTON J., TSUGITA A., TERZAGHI E., INOUE M. 1966 - Frameshift mutations and the genetic code
Cold Spring Harbor. Symp. quant. Biol. 31, 77-84.

- THOMAS C.A. Jr 1966 - Recombination of DNA molecules. dans "Progress in nuclei acid research and molecular biology" Davidson et cohn éditeurs.
- TEMPERS H.P., SPINELLI V. BELSER N.O. 1954
- A factor (or mutator gene) influencing mutation rates in E. coli.
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 55, 274-281.
- VON BORSTEL R.C. 1969 - On the origin of spontaneous mutations .
Japan J. Genetics 44, supp. 1 102-105.
- WAGNER R.P., BERGQUIST A., BARBEE T., KIRITANI K. 1964
- Genetic blocks in the isoleucine-valine pathway of Neurospora crassa.
Genetics 49 865-882.
- WHITEHOUSE H.L.K. 1967 - A cycloid model for the chromosome.
J. Cell Sci. 2, 9-22.
- 1969 - Towards an understanding of the mechanism of heredity. second edition -Arnold editeur-.
- YANOFSKY C., COX E.C. HORN V. 1966 - The unusual mutagenic specificity of an E coli mutator gene.
Proc. Nat. Acad. Sci. 55, 274-281.
- ZAMENKOF P.J. 1970 - Studies of the possible product of a bacterial mutator gene.
Mut. Res. 9, 549-552.

